

---

**CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES  
AGRONOMIQUES - MONTPELLIER SUPAGRO**

---

***THESE***

*Pour obtenir le grade de*

**DOCTEUR DU CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN  
SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ECOLE DOCTORALE: SCIENCES DES PROCEDES – SCIENCES DES ALIMENTS  
Discipline : Biochimie et biologie moléculaire**

*Présentée et soutenue publiquement par*

***Fida KHATER***

*le 12 Juillet 2011*

**IDENTIFICATION ET VALIDATION FONCTIONNELLE  
DE NOUVEAUX GENES POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LA  
BIOSYNTHESE DES COMPOSES PHENOLIQUES**

---

**JURY**

Isabelle Debeaujon	Chargée de recherche INRA, Versailles	Rapporteur
Christian Chervin	Professeur, ENSAT, Toulouse	Rapporteur
Eric Dubreucq	Professeur, Montpellier SupAgro	Examineur
Laurence Lesage-Meessen	Chargée de recherche, INRA Marseille	Examineur
Nancy Terrier	Chargée de recherche INRA, Montpellier	Examineur
Véronique Cheynier	Directeur de Recherche, INRA Montpellier	Directeur de thèse

## ABSTRACT

---

Grape proanthocyanidins (PA) play a major role in organoleptic properties of wine, being involved in astringency and color stability. They are accumulated in skin and seeds during early stages of berry development. Numerous structural genes involved in PA biosynthesis have been identified in various plant species including grapevine but some steps are still not documented.

A previous transcriptomic study led to identify new genes putatively involved in the PA pathway in grape. These included genes coding for 3 glucosyltransferases and 2 glucose acyl transferases. The objective of this work is to clarify the function of these genes in the phenylpropanoid pathway.

The three glucosyltransferases called VvgGT1, VvgGT2, VvgGT3 displayed high sequence similarities between them and with other plant glucosyltransferases catalyzing the formation of glucose esters. The transcripts are expressed in the early stages of grape berry development, mainly in skins and seeds and also in the pulp for *VvgGT2*. The properties of these 3 enzymes were studied *in vitro* after production of recombinant proteins. The three of them are able to catalyse the synthesis of glucose ester with hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids as substrates and with similar kinetic properties.

Two glucose-acyltransferases called *VvGAT1* and *VvGAT2* were isolated. They displayed high sequence similarity with other glucose dependent acyltransferases belonging to the Serine carboxypeptidase like family. The transcripts are expressed in the early stages of grape berry development mainly in skins and seeds for *VvGAT1* and in pulp and seeds for *VvGAT2*. Heterologous expression of the proteins in different hosts was unsuccessful. The confocal microscopy data performed on grapevine transgenic hairy-roots suggest that *VvGAT1* fused to GFP are localized in cytosolic vesicles.

The successive involvement of these enzymes in the galloylation of PA and in the synthesis of hydroxycinnamic esters is discussed.

## RESUME

---

Les proanthocyanidines (PA) du raisin jouent un rôle majeur dans les propriétés organoleptiques du vin, notamment dans l'astringence et la stabilité de la couleur. Elles sont accumulées principalement dans la pellicule et les pépins pendant les premiers stades du développement de la baie. La biosynthèse des PA commence à être bien décrite chez les plantes, dont la vigne. Cependant certaines étapes restent à élucider.

Une étude de transcriptomique avait permis d'identifier de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse des PA. Parmi ces gènes figuraient 3 glucosyltransférases et 2 glucose-acyltransférases.

Les trois glucosyltransférases, VvgGT1, VvgGT2 et VvgGT3, présentent de fortes homologies entre elles et avec d'autres glucosyltransférases capables de catalyser la formation de glucose ester. Les transcrits sont exprimés durant les premiers stades de développement de la baie principalement dans les pépins et la pellicule mais aussi dans la pulpe pour *VvgGT2*. Les propriétés de ces 3 enzymes ont été étudiées *in vitro* après production de protéines recombinantes. Les 3 VvgGTs sont capables de catalyser la synthèse d'esters de glucose à partir d'acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques.

Deux acyltransférases *VvGAT1* et *VvGAT2* ont été isolées. Elles présentent de fortes similarités avec des acyltransférases glucose-ester dépendantes de type serine carboxypeptidase like. Les transcrits sont exprimés surtout avant la véraison, dans les pépins et la pellicule pour *VvGAT1* et dans la pulpe et les pépins pour la *VvGAT2*. L'expression hétérologue dans différents hôtes n'a pas permis de détecter d'activité enzymatique. Les analyses en microscopie confocale sur des hairy-roots de vignes transgéniques suggèrent que *VvGAT1* fusionnée à une GFP est localisée dans des vésicules cytoplasmiques.

L'implication successive des VvgGTs et des VvGATs dans la galloylation des PA et dans la synthèse d'esters d'acides hydroxycinnamiques est discutée.

*... Je dédie cette thèse à ma maman...*

*...Thèse à la mémoire de David Fournand...*

*Le véritable voyage de découverte ne consiste pas à chercher de nouveaux paysages mais à avoir de nouveaux yeux*

*Marcel Proust*

## REMERCIEMENTS

C'est une habitude saine de remercier au début d'un mémoire de thèse tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à rendre possible ce travail. Même si dans mon cas, cette liste pourrait sembler plus longue que dans les coutumes, c'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui à leur manière m'ont aidé à mener à bien cette thèse.

J'exprime tout d'abord ma gratitude à Véronique Cheynier, pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse au sein de l'équipe polyphénol – interactions. Merci pour tes encouragements et tes précieux et judicieux conseils scientifiques. Merci aussi pour la confiance que tu m'as apportée et dont j'avais besoin pour continuer à parcourir cette aventure de rêve et de défi.

Je remercie tout particulièrement, Nancy Terrier, mon encadrante de thèse pour avoir accepté de me diriger patiemment après la disparition de David. Merci Nancy pour ton soutien constant pendant toute la durée de la thèse et durant la rédaction. Merci pour m'avoir transmis ton dynamisme et tes compétences professionnelles et scientifiques et de m'avoir donné cette envie d'explorer le domaine de la biologie moléculaire. Merci pour ta disponibilité, ta présence et ton encadrement.

Je tiens à remercier Mme Debeaujon et Mr Chervin pour avoir accepté la charge d'être Rapporteurs de ma thèse et merci à Mme Laurence Lesage- Meesen et Mr Eric Dubreucq d'avoir accepté d'examiner ces travaux.

J'adresse mes sincères remerciements pour Christian Jay-Allemand et Eric Dubreucq pour avoir accepté d'être membres de mon comité de pilotage de thèse. Merci pour vos conseils et les remarques pertinentes. Je ne peux oublier Bruno Blondin pour son soutien et ses encouragements qui m'ont beaucoup aidée.

Je remercie Sandrine Vialet pour ses conseils et son suivi. Mes sincères remerciements s'adressent à Jean Luc Guiraud pour son aide et sa disponibilité pour les analyses. Je remercie aussi Thérèse Marlin d'avoir pris le relais pour mes dernières expérimentations sans oublier Clotilde Verries et Agnès Ageorges pour les discussions très enrichissantes que nous avons eues à plusieurs reprises. Je ne me contente pas de vous remercier pour votre aide professionnelle, j'aimerais rajouter mes remerciements pour tous les bons moments que j'ai passés avec vous. Martine, un remerciement spécial pour toi, pour ta gentillesse et la paix que tu apportais à la petite équipe des Gaulois.

J'adresse mes sincères remerciements à Emmanuelle Meudec pour son aide scientifique et technique et sa patience lors de mes nombreuses sollicitations pour les analyses

en HPLC-masse. J'adresse aussi un remerciement particulier à Louise Sidhoum pour son assistance durant les premières expérimentations de ma thèse.

Je dois tout de même un remerciement à Nicolas Sommerer et Arnaud Verbera pour leur aide en analyse HPLC et masse.

Je remercie François- Xavier Sauvage qui m'a toujours accueillie avec beaucoup de gentillesse et aidée dans les expérimentations sur les protéines et les gels d'électrophorèse.

Je n'oublie sûrement pas Patrick Chemardin qui était là pour veiller sur l'état d'âme des fermenteurs. Merci beaucoup Patrick pour ta disponibilité et ta gentillesse. Merci à Véro, Cathy pour leurs conseils et les discussions intéressantes lors de mes expériences à la Halle.

Je tiens également à remercier Michel Rossignol et Sonia Hem et la plateforme du Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle- INRA pour leur assistance dans le séquençage protéique.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe des polyphénols et interaction qui m'a encouragée et m'a soutenue durant la durée de cette thèse. Mes remerciements s'adressent aussi aux thésards et aux stagiaires que j'ai rencontrés à l'UMR SPO.

Une pensée particulière à Virginie Galeote, ma collocatrice de bureau. Je te remercie vivi pour tes encouragements et les nombreuses discussions de colocataires qui m'ont souvent remontée le moral.

Je ne peux finir ces remerciements sans faire hommage à David : Souvent on rencontre des personnes qui nous apportent quelque chose de merveilleux, une certaine conscience pour nous permettre de vivre différemment et agréablement. A mon petit monde, et c'est ce qui est le plus extraordinaire, David Fournand a su transmettre son caractère combatif, son enthousiasme, son envie d'aller de l'avant et sa joie de vivre. Ce n'était malheureusement que pour 8 mois ... De longues conversations passionnantes tant scientifiques, professionnelle que quotidiennes m'ont encouragée. J'ai beaucoup apprécié l'attention que tu m'as portée tout en respectant ta carrière professionnelle et tes engagements. Tes encouragements, ton soutien, ta bienveillance, je dirai même tes dispositions fraternelles et affables envers moi m'ont réconfortée et ont renforcé ma volonté de franchir une étape et de faire un nouveau pas. A grands renforts, j'ai poursuivi ma thèse et aujourd'hui à mon tour, je te rends hommage, je te dédie cette thèse... David, tu resteras une formidable personne que je n'oublierai jamais...

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>17</b>
1. HISTORIQUE.....	18
2. IMPORTANCE ECONOMIQUE .....	18
<b>CHAPITRE 1: BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>20</b>
1. PRESENTATION ET CLASSIFICATION DE LA VIGNE.....	21
2. LA BAIE DE RAISIN.....	21
2.1. Morphologie.....	21
2.2. Développement.....	22
3. LES COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN .....	25
3.1. Les acides phénoliques.....	25
3.2. Les stilbènes .....	28
3.3. Les flavonoïdes.....	29
3.3.1. Les flavonols .....	30
3.3.2. Les Anthocyanes.....	31
3.3.3. Les flavan 3-ols.....	33
3.3.3.1. Cinétique d'accumulation, localisation et compartimentation des flavanols dans la baie.....	35
3.3.4. Rôle des flavonoïdes .....	36
3.3.4.1. Pour la plante .....	36
3.3.4.2. Pour la santé humaine et l'industrie .....	37
4. BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES .....	38
4.1. Les enzymes de la voie : Description des gènes structuraux et expression durant le développement chez le raisin.....	38
4.1.1. Les enzymes de la partie amont de la voie .....	39
4.1.2. Les enzymes de la partie aval de la voie .....	42
4.2. Polymérisation des flavan-3-ols.....	44
4.3. Transport et stockage des flavonoïdes .....	46
4.3.1. L'implication de « protéines de transport » .....	48
4.3.1.1. Les glutathion S-transférases .....	48
4.3.1.2. Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) et ATPases.....	48
4.3.1.3. Les transporteurs de type MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion).....	50
4.3.1.4. Transporteur de types BTT .....	51
4.3.2. Le modèle vésiculaire .....	52
4.4. Régulation de la voie de biosynthèse.....	53
5. PROBLEMATIQUE.....	56
<b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>57</b>
1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	58
1.1. Matériel végétal.....	58

1.2. Souches bactériennes et levuriennes .....	58
1.2.1. Escherichia coli DH5α® .....	58
1.2.2. Escherichia coli BL21(DE3) .....	59
1.2.3. Pichia pastoris x33.....	59
1.2.4. Saccharomyces cerevisiae W2579 .....	59
1.2.5. Saccharomyces cerevisiae INVSc1 .....	59
1.2.6. Agrobacterium rhizogenes A4.....	59
1.3. Plasmides.....	60
1.3.1. pGEM-T-easy et PGEM- T .....	60
1.3.2. pENTR/D-TOPO® .....	60
1.3.3. PGEX- 4T-2 .....	61
1.3.4. pPICαZ.....	62
1.3.5. pYES2 .....	62
1.3.6. Vecteur d'expression PH7FWG2.....	63
1.4. Conditions de culture .....	63
1.5. Conservation des souches.....	64
2. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	64
2.1. Extraction acides nucléiques.....	64
2.1.1 Extraction d'ADN plasmidique.....	64
2.1.2. Extraction d'ARN total .....	64
2.1.3. Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) pour PCR quantitative .....	65
2.2. PCR .....	65
PCR quantitative.....	65
2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	66
2.4. Extraction de fragments d'ADN à partir de gel d'agarose.....	66
2.5. Séquençage et amorces nucléotidiques .....	67
2.6. Ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur .....	68
2.7. Recombinaison homologue par la technologie GATEWAY (Invitrogen) .....	69
2.8. Techniques de transformation .....	69
2.8.1. Transformation d'E. coli par choc thermique.....	69
2.8.2. Transformation de S. cerevisiae par choc thermique .....	69
2.8.3. Transformation des levures Pichia pastoris par électroporation.....	70
2.8.3.1. Préparation des cellules compétentes .....	70
2.8.3.2. Transformation des cellules compétentes.....	71
2.8.4. Transformation des Agrobacterium rhizogenes A4 par électroporation .....	71
2.8.4.1. Préparation des bactéries compétentes .....	71
2.8.4.2. Transformation des bactéries compétentes.....	71
2.8.5. Transformation de vitroplants de vigne par A. rhizogenes A4.....	72
3. PRODUCTION DE PROTEINES.....	72
3.1. Expression chez les procaryotes (E. coli).....	72
3.1.1- Induction de la synthèse de la protéine recombinante.....	72
3.1.2. Préparation du lysat cellulaire bactérien.....	72
3.1.3. Purification de l'enzyme.....	73
3.2. Expression chez les Eucaryotes (Pichia Pastoris, S. cerevisiae W2579 et S. cerevisiae INVSc) .....	73
3.2.1. Culture en mode micro- fermenteurs de Pichia pastoris.....	73
3.2.2. Culture en bioréacteur de Pichia pastoris .....	74
3.2.2.1. Pré-culture en erlenmeyer.....	74

3.2.2.2. Culture en fermenteur en mode fed- batch .....	74
3.2.2.3. Cultures des <i>S. cerevisiae</i> W2579 et <i>S. cerevisiae</i> INVSc1 .....	74
4. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES .....	75
4.1. <i>Diafiltration</i> .....	75
4.2. <i>Dosage des protéines par la méthode Bradford</i> .....	75
4.3. <i>Préparation du gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)</i> .....	75
4.4. <i>Analyse protéomique des séquences</i> .....	76
4.4.1. <i>Digestion trypsique dans le gel</i> .....	76
4.4.2. <i>Spectrométrie de masse</i> .....	77
4.5. <i>Hydrolyse en milieu basique</i> .....	78
4.6. <i>Analyse par HPLC</i> .....	78
4.7. <i>Spectrométrie de masse</i> .....	78
4.8. <i>Analyse par électrophorèse capillaire</i> .....	78
5. PREPARATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES ET REACTIONS ENZYMATIQUES.....	79
5.1. <i>Etudes des glucosyltransférases</i> .....	79
5.1.1. <i>Détermination du pH optimum, études des spécificités des substrats</i> .....	79
5.1.2. <i>Etudes des paramètres cinétiques</i> .....	80
5.1.3. <i>Etudes des activités des glucosyltransférases en présence d'ions</i> .....	80
5.2. <i>Etude des glucose-acyltransférases</i> .....	80
6. IMAGERIE .....	81
6.1. <i>Préparation des tissus végétaux</i> .....	81
6.2. <i>Observations microscopiques</i> .....	81
<b>CHAPITRE 3 : LES GLUCOSYLTRANSFERASES .....</b>	<b>82</b>
1. INTRODUCTION.....	87
2. EXPERIMENTAL PROCEDURES .....	89
2.1. <i>Plant material and nucleic acid extraction</i> .....	89
2.2. <i>Real-Time PCR</i> .....	90
2.3. <i>Cloning and Vectors</i> .....	91
2.4. <i>Sequences analysis</i> .....	91
2.5. <i>Heterologous expression of the 3 VvgGTs</i> .....	91
2.6. <i>Enzyme assays</i> .....	92
2.7. <i>Identification of the VvgGTs products</i> .....	93
2.8. <i>Quantification and statistical analysis: Capillary electrophoresis analysis</i> .....	93
3. RESULTS .....	94
3.1. <i>Identification of three putative glucosyltransferases</i> .....	94
3.2. <i>Expression of VvgGT1, VvgGT2 and VvgGT3</i> .....	96
3.3. <i>Enzymatic activity of the recombinant enzymes</i> .....	97
3.4. <i>Kinetic parameter of the three recombinant proteins</i> .....	103
4. DISCUSSION.....	105
4.1. <i>VvgGTs are glucose-ester forming enzymes</i> .....	105
4.2. <i>The VvgGTs could be involved in the production of hydroxycinnamic esters and PA galloylation using glc-esters as intermediate</i> .....	107
<i>Effet de l'addition de sel</i> .....	109
<i>Effet de la substitution de l'UDP- glucose par d'autre UDP- Sucre</i> .....	111
5. PERSPECTIVES .....	112

<b>CHAPITRE 4 : LES ACYLTRANSFERASES .....</b>	<b>114</b>
1. INTRODUCTION.....	115
1.1. <i>La famille des gènes d'acyltransférases de type BAHD chez les plantes.....</i>	<i>115</i>
1.2. <i>La famille des gènes d'acyltransférases de type SCPL chez les plantes .....</i>	<i>116</i>
2. RESULTATS ET DISCUSSION.....	119
2.1. <i>Identification des glucose- acyltransférases :</i> .....	<i>119</i>
2.2. <i>Expression de VvGAT1 et VvGAT2 .....</i>	<i>126</i>
2.3. <i>Localisation intracellulaire de VvGAT1bis.....</i>	<i>128</i>
2.4. <i>Expression hétérologue des GATs.....</i>	<i>129</i>
2.4.1. Dans E. coli .....	129
2.4.2. Dans un système eucaryote .....	134
2.4.2.1. Dans P. pastoris .....	134
2.4.2.1.1. Expression des GATs dans P. pastoris sans le tag d'adressage dans le système de micro- fermenteurs.....	134
2.4.2.1.2. Production de p. pastoris contenant VvGAT1 et le Témoin en fermenteur. ...	136
2.4.2.1.3. Etude de l'activité enzymatique des protéines.....	137
2.4.2.1.4. Analyse protéomique des bandes .....	139
2.4.2.1.5. Discussion.....	139
2.4.2.2. Expression des VvGATs dans S. cerevisiae et purification de la protéine.....	141
2.4.2.2.1. S. cerevisiae W2579 .....	141
2.4.2.2.2. S. cerevisiae INVSc1 .....	142
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>145</b>
1. BILAN DES RESULTATS:.....	146
2. PERSPECTIVES GENERALES .....	148
2.1. <i>Validation fonctionnelle in vitro.....</i>	<i>148</i>
2.2. <i>Validation fonctionnelle in vivo.....</i>	<i>148</i>
2.3. <i>A la recherche des acteurs manquants .....</i>	<i>148</i>
3. ENJEUX A LONG TERME DE CE TRAVAIL.....	149
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>150</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>188</b>
ANNEXE 1 : SEQUENCES PROTEIQUES.....	189
ANNEXE 2 : MILIEU DE CULTURE.....	190
ANNEXE 3 : TECHNIQUE DE CULTURE DE PICHIA PASTORIS : SYSTEME DE PRODUCTION.....	196
ANNEXE 4 : ANALYSE DES SEQUENCES DES PEPTIDES PRODUITS PAR P. PASTORIS.....	198

## LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1. Schéma d'une baie de raisin (d'après Coombe, 1987) .....</i>	22
<i>Figure 2. Etapes de la croissance d'une baie de raisin. ....</i>	23
<i>Figure 3. Schéma de l'évolution des principaux constituants au cours de la maturation de la baie de raisin .....</i>	25
<i>Figure 4. Structures de divers acides hydroxybenzoïques .....</i>	26
<i>Figure 5. Structure des principaux acides hydroxycinnamiques du raisin.....</i>	26
<i>Figure 6. Structures chimiques des principaux esters hydroxycinnamiques présents dans le raisin .....</i>	27
<i>Figure 7. Structure chimique de quelques stilbènes présents dans le raisin.....</i>	29
<i>Figure 8. Squelette carboné des flavonoïdes et numérotation adoptée.....</i>	30
<i>Figure 9. Structures chimiques de quelques flavonols présents dans le raisin.....</i>	30
<i>Figure 10. Principales anthocyanes présentes dans la baie de raisin. ....</i>	32
<i>Figure 11. Structure des flavan-3-ols monomères du raisin.....</i>	33
<i>Figure 12. Structures chimiques des proanthocyanidines dimères de type B et de type A. ....</i>	34
<i>Figure 13. Structure des proanthocyanidines polymères .....</i>	35
<i>Figure 14. Voies de biosynthèse des principales classes de flavonoïdes chez la vigne .....</i>	40
<i>Figure 15. Réaction catalysée par la leucoanthocyanidine réductase (LAR).....</i>	43
<i>Figure 16. Réaction catalysée par l'anthocyanidine réductase (ANR).....</i>	43
<i>Figure 17. Schéma hypothétique du modèle de transport des flavonoïdes. ....</i>	47
<i>Figure 18. Représentation schématique des plasmides pGEMT et pGEMT- easy.....</i>	60
<i>Figure 19. Représentation schématique du plasmide pENTR/ SD/D et de son site de clonage.....</i>	61
<i>Figure 20. Représentation schématique du plasmide pGEX-4T-2 et de son site de clonage.....</i>	61
<i>Figure 21. Représentation schématique du vecteur d'expression pPICZa.....</i>	62
<i>Figure 22. Représentation schématique du vecteur d'expression pYES2 (Invitrogen).....</i>	63
<i>Figure 23. Représentation schématique du Vecteur d'expression pH7FWG2.....</i>	63
<i>Figure 24. Phylogenetic relationship of 3 VvgGTs cloned from Vitis vinifera with 19 other functionally characterized glucosyltransferases from several other plant species. ....</i>	95
<i>Figure 25. Quantitative real time PCR expression. ....</i>	96
<i>Figure 26. Substrates specificity of the 3 recombinant VvgGTs tested in vitro at pH 6.5. ....</i>	98
<i>Figure 27. Effect of pH on in vitro activity of the three VvgGTs with gallic acid as substrate. ....</i>	99
<i>Figure 28 Chemical structures of some substrates and products of VvgGTs. ....</i>	100
<i>Figure 29. Characterization of the VvgGT protein product (p-hydroxybenzoyl- glucose).....</i>	101
<i>Figure 30. Characterization of the VvgGT protein product (caffeoil-glucose).....</i>	102
<i>Figure 31. Effets de l'addition d'ions (1mM final) au milieu réactionnel des VvgGTs.....</i>	110
<i>Figure 32. Activité des GTs en présence de l'UDP- Galactose en tant que donneur sucre .. ....</i>	112

<i>Figure 33. Analyse phylogénétique d'acyltransférases et de SCP issues de différentes espèces.</i>	122
<i>Figure 34. Alignement des séquences protéiques de VvGAT1, VvGAT1bis et VvGAT2 avec des protéines de type SCP et SCPL.....</i>	125
<i>Figure 35. Profils d'expression obtenus par PCR quantitative des gènes (A) VvGAT1, (B) VvGAT1bis et (C) VvGAT2 au cours du développement de la baie (Syrah).</i>	127
<i>Figure 36. Localisation de GAT1bis-GFP dans des hairy roots de vigne.</i>	129
<i>Figure 37. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.</i>	131
<i>Figure 38. Electrophorégramme à 280nm.....</i>	132
<i>Figure 39 A) Profil chromatographique à 280 nm.....</i>	133
<i>Figure 40. Séparation et mise en évidence des différentes protéines produites suite à une production en mode micro-fermenteurs.....</i>	135
<i>Figure 41. Séparation et mise en évidence des différentes protéines produites par le clone positif c contenant pPicZαA-VvGAT1 et le témoin t contenant le vecteur pPicZαA vide.....</i>	137
<i>Figure 42. Profil chromatographique (TIC) à 280 nm des produits formés suite aux réactions enzymatiques effectuées en présence d'EC et de β-glucogalline.....</i>	138

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1. Exemples de facteurs de transcription de type MYB intervenant dans la synthèse des flavonoïdes chez Vitis vinifera.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 2 : Liste des souches bactériennes et souches de levures utilisées dans ce travail....</i>	<i>58</i>
<i>Tableau 3. Amorces utilisées lors de l'étude des VvGTs .....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 4. Amorces utilisées lors de l'étude des VvGATs.....</i>	<i>68</i>
<i>Table 5. Gene - specific primers for amplification .....</i>	<i>90</i>
<i>Table 6. Retention times and molecular ion and fragment ions of Glc esters formed by VvgGT3 and the corresponding phenolic acids.....</i>	<i>103</i>
<i>Table 7. Michaelis - Menten Kinetics (<math>K_m</math>, <math>V_m</math> values and catalytic efficiency <math>K_{cat}/K_m</math>) of the three recombinant VvgGTs toward gallic acid (1A), and caffeic acid (1B) at 3 pH (6.5/ 7.5/ 8.5).....</i>	<i>104</i>
<i>Tableau 8. Taux d'inhibition de l'activité enzymatique des 3 VvgGTS en pourcentage en fonction du pH et de l'ion ajouté au milieu réactionnel.....</i>	<i>111</i>
<i>Tableau 9. Diminution de l'activité enzymatique des 3 VvgGTS en pourcentage suite à une substitution de l'UDP- glucose par l'UDP - galactose.....</i>	<i>112</i>
<i>Tableau 10. Différentes acyltransférases de type SCPL (ou acceptant des ester de glucose comme donneur d'acyle) étudiées dans la littérature.....</i>	<i>118</i>
<i>Tableau 11. Identité nucléique (IdN), identité/ similarité protéiques (Id/S a.a) des VvGAT1, VvGAT2 et VvGAT1bis. ....</i>	<i>121</i>

## LISTE DES ABREVIATIONS

4CL	4-Coumaroyl:CoA-Ligase
aa	Acide Aminé
ABA	Acide Abscissique
ABC	ATP Binding Cassette
ACP	Anthocyanoplastes
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AHCT	Anthocyane O-hydroxycinnamoyltransférase
ANR	Anthocyanidine Réductase
ANS	Anthocyanidine Synthase
APVs	Anthocyanic Pre-vacuolar Vesicles
ATP	Adénosine Triphosphate
AVIs	Anthocyanic Vacuolar inclusions
BEAT	Benzyl Alcool O-Acétyletransférase
BET	Bromure d'Ethidium
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
BTL	Bilitranslocase
C4H	Cinnamate-4-Hydroxylase
CHI	Chalcone Isomérase
CHS	Chalcone Synthase
Ct	Cycle threshold
DAD	Diode array Detector / à barrette de diodes
DAPI	4'6' Di Amidino-2-Phényl Indole
DAT	Déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase
DBD	DNA Binding Domain
DEPC	Diéthyl Pyrocarbonate
DFR	Dihydroflavonol 4-Réductase
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucléoside 5'Triphosphate
DTT	Dithiothréitol
EBG	Early Biosynthetic Genes (gènes de biosynthèse précoces)
EC/ CE	Electrophorèse capillaire
ECG	Epicatéchine 3-O-gallate
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ESI	Electrospray ionization
EST	Expressed Sequence Tag
F3'5'H	Flavonoïde 3',5'-Hydroxylase
F3'H	Flavonoïde 3'-Hydroxylase
F3H	Flavanone 3-hydroxylase
FLS	Flavonol Synthase
FT	Facteur de Transcription
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion S-transférases
GT	Glucosyltransférases
HBA	Acide hydroxy-benzoïque

HCA	Acide hydroxy-cinnamique
HCBT	N-hydroxycinnamoyl-benzoyltransférase
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
IPTG	Isopentényl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Kcat	Constante catalytique
Km	Constante de Michaelis
LAR	Leucoanthocyanidine Réductase
LB	Luria Bertani
LBG	Late Biosynthetic Genes (gènes de biosynthèse tardifs)
LDOX	Leucoanthocyanidine Dioxygénase
LT	Transport escorté par des ligands
MATE	Multidrug and Toxic Extrusion family
MES	Acide 2-( <i>N</i> -morpholino)éthanesulfonique
MS	Murashige et Skoog
Myb	MYB DNA-binding domain
MYC	MYC DNA-binding domain
NA	<i>Normalized Area</i>
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NMR	Nuclear magnetic resonance
OIV	Organisation internationale de la vigne et du vin
OMT	O-Méthyltransférase
ON	Over Night (~ 16h)
OTEX	Orientation technico-économiques
PA	Proanthocyanidine
pABA	p- Amino benzoate
PAL	Phénylalanine Ammonialyase
PAs	Proanthocyanidines
PBS	Phosphate Saline Buffer AD Activation Domain
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PEG	Polyéthylène Glycol
pH	Potentiel Hydrogène
pO <sub>2</sub>	Pression partielle d'oxygène
PVCs	Structures prévacuolaires
QTL	Quantitative trait loci
RE ou ER	Réticulum Endoplasmique
RED	Déshydrogénase réductase épimérase
R-HR	Red transgenic hairy roots
RNase	Ribonucléase
RT	Reverse Transcription
SCP	Serine carboxypeptidases
SCPL	serine carboxypeptidases-like
SD	Synthetic Dropout
SDS	Dodécylsulfate de Sodium
SG	synapoyl- glucose
STS	Stilbène Synthase
TA	temperature ambiante
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
T-HR	transgenic hairy roots
Tm	Melting Temperature

<i>tt</i>	Phénotype <i>transparent testa</i>
UDP	Uridine DiPhosphate
UDPG	Uridine DiPhosphate Glucose
UFGT	UDP-glucose: Flavonoid Glycosyl transférase
UGT	Uridine Diphosphate Glucose Glucosyltransferase
UV	Ultraviolet
V <sub>m</sub>	Vitesse maximale
VT	transport vésiculaire
V <sub>v</sub>	<i>Vitis vinifera</i>
V <sub>v</sub> GAT	<i>Vitis vinifera</i> glucose acyltransferase
V <sub>v</sub> gGT	<i>Vitis vinifera</i> galloyl glucosyltransferase
WT	Wild-Type (type sauvage)
X-Gal	5-bromo 4-chloro 3-indole 1-D-galactopyranoside

### **Unité et facteurs de multiplication**

°C	degré celsius
μ	micro (10 <sup>-6</sup> )
Da	Dalton
DO	Densité Optique
g	gramme
h	heure
j	jour
k	kilo
L	Litre
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Molaire (mole/Litre)
min	minute
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
p	pico (10 <sup>-12</sup> )
Pa	Pascal
pb	paire de base
p/v	poids/volume
pH	potentiel Hydrogène
SAF	Semaines Après Floraison
s	seconde
U	Unité enzymatique
v/v	volume/volume
Ω	ohm
V	volt
Kat	katal

## **INTRODUCTION GENERALE**

## **1. HISTORIQUE**

L'histoire de la vigne et du vin est si ancienne qu'elle se confond avec l'histoire de l'humanité. Née en Orient, environ 7000 ans avant JC, la vigne sauvage s'est étendue vers l'Est et l'Ouest. Les peuples antiques d'Asie occidentale (les Sumériens, les Babyloniens, les Assyriens, les Égyptiens, les Hébreux, les Phéniciens...) ont été les premiers à la domestiquer pour en faire une culture qui s'est pleinement étendue sur les rives de la Méditerranée. Les Grecs, initiateurs de la viticulture en Europe méditerranéenne, ont été relayés dans leur œuvre civilisatrice par les Romains : la Sicile et le sud de l'Italie d'abord, les régions côtières de la France et de l'Espagne ensuite. Avec l'arrivée des Romains, la culture de la vigne a connu une extension systématique à travers la Gaule. Elle s'est répandue au 1<sup>er</sup> siècle dans la vallée du Rhône, est apparue au II<sup>ème</sup> siècle en Bourgogne et dans le Bordelais, pour atteindre la vallée de la Loire au III<sup>ème</sup> siècle, la Champagne et la vallée de la Moselle au IV<sup>ème</sup> siècle, puis s'implanter jusqu'aux frontières septentrionales de l'Empire.

## **2. IMPORTANCE ECONOMIQUE**

En 2010 et selon les données de l'Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV), le vignoble mondial a une superficie estimée à environ 7 550 000 ha et la production mondiale de vin se situait à environ 260 millions d'hectolitres (OIV). Selon la note de conjoncture de l'Organisation internationale de la Vigne et du Vin de mars 2010, la France produit 44 963 000 hl de vin avec une superficie de 825 000 ha. La production viticole est assurée par 71 000 exploitations (OTEX viticulture).

Aujourd'hui, la viticulture française est à un tournant de son histoire. L'évolution de l'alimentation, les changements de modes de vie, les politiques de santé publique, l'apparition de nouveaux pays producteurs et de nouveaux pays consommateurs, mais aussi la réforme de l'Organisation Communes de Marché imposent des adaptations importantes. Malgré cette réforme, la qualité et la typicité du vin français restent ses atouts majeurs. D'où la nécessité de conforter l'excellence, en maintenant voire en améliorant la qualité organoleptique du vin français pour garder cette image de vins de luxe, porteurs de prestige et de savoir-faire.

Bien que nous ne puissions pas définir de façon universelle la qualité, des critères communs à tous les types de productions sont à signaler. Ainsi la teneur en sucre, l'acidité totale, la teneur en composés phénoliques et composés d'arômes en sont les plus importants. La taille des baies peut également être citée comme facteur de qualité. L'optimisation et la maîtrise de ces paramètres permettent de limiter les corrections œnologiques et d'obtenir un vin de meilleure qualité.

Pour ce faire, la maîtrise des techniques culturales pourrait être l'une des solutions contribuant à donner un caractère unique, une « typicité » aux raisins récoltés. Un certain nombre de techniques culturales sont indispensables, dont, notamment, à titre d'exemples, l'incision annulaire, l'éclaircissage, la taille appropriée, les ébourgeonnages, les applications des régulateurs de croissance et l'entretien du sol. Ceci dit, ces approches agronomiques sont loin d'être généralisables. En définitive, la qualité reste principalement dépendante des caractéristiques du matériel végétal qui doit contenir des teneurs suffisantes en métabolites primaires (sucres, acides) et en composés secondaires (composés d'arômes, composés phénoliques).

Les composés phénoliques présentent une grande diversité de structures. Ils se divisent en flavonoïdes et non flavonoïdes. Parmi les flavonoïdes (basés sur une structure en C6-C3-C6), les anthocyanes et les flavan-3-ols sont particulièrement importants en œnologie puisqu'ils constituent respectivement les pigments rouges du raisin et les tanins, responsables de l'astringence. Les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) sont d'autres composés majeurs du raisin du fait de leur rôle dans les phénomènes de brunissement oxydatif intervenant en particulier dans les moûts blancs. Chacune de ces familles comprend un grand nombre de structures résultant des substitutions de leur squelette de base (présence d'hydroxyles supplémentaires, méthylation, glycosylation, acylation) qui modifient leurs propriétés.

Le suivi des composés phénoliques au cours du développement de la baie et la compréhension des mécanismes impliqués dans leur synthèse s'imposent comme des approches complémentaires pour la maîtrise de la qualité du raisin. Avec les progrès de la biologie moléculaire, certains des mécanismes impliqués dans la biosynthèse de ces composés ont été établis. Un nombre relativement limité d'étapes clés sont nécessaires à la biosynthèse de la structure de base de ces métabolites et les gènes correspondants sont aujourd'hui en grande partie connus. Cependant, certaines étapes de cette voie, notamment celles qui interviennent dans la « décoration » des structures de base restent à élucider.

L'association de résultats, obtenus à l'issue de la recherche de Quantitative Trait Loci (QTL) et d'études transcriptomiques après surexpression d'un facteur de transcription régulant la voie de biosynthèse des Flavonoïdes, a permis l'identification de plusieurs gènes candidats potentiellement impliqués dans la synthèse de ces composés. L'objectif de ce travail est de valider la fonction de ces gènes, d'identifier et de caractériser les enzymes pour lesquelles ils codent, ainsi que leur rôle dans les étapes ultimes de formation de certains métabolites phénoliques.

## **CHAPITRE 1: BIBLIOGRAPHIE**

## 1. PRESENTATION ET CLASSIFICATION DE LA VIGNE

La vigne est une plante pérenne et rustique, à croissance indéterminée et à fruits charnus (Gary *et al.*, 2003) appartenant à la famille des *Vitaceae* ou *Ampelidaceae* (ordre des Rhamnales). Cette famille comprend dix-neuf genres (Galet, 2000), dont le genre *Vitis*, originaire des zones chaudes ou tempérées de l'hémisphère Nord (Amérique, Europe et Asie). Le genre *Vitis* est divisé en 2 sous-genres ou sections, le sous-genre *Muscadinia* ( $2n = 40$  chromosomes) et le sous-genre *Euvinis* ( $2n = 38$  chromosomes) comprenant la quasi-totalité des vignes cultivées. Dans le sous-genre *Euvinis*, on distingue 3 grands groupes de vignes: les vignes américaines comprenant une vingtaine d'espèces dont les principales sont *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. rupestris* et *V. berlandieri* introduites en Europe au début du XIX<sup>ème</sup> siècle et qui sont utilisées aujourd'hui comme porte-greffe pour leur résistance aux maladies, les vignes asiatiques qui ne sont pas résistantes aux maladies (Oïdium, Mildiou, Black-rot...) mais sont utilisées dans les programmes de croisements interspécifiques pour leur résistance au froid (Galet, 2000) et les vignes euroasiatiques qui ne comprennent qu'une seule espèce, *Vitis vinifera* Linné (Alleweldt, 1957, 1959, 1963a et b, 1964, Huglin et Schneider, 1998). Son génome présente une taille de 497 Mb, et comprend 30434 gènes putatifs codant pour une protéine (Jaillon *et al.*, 2007). La Vigne cultivée, *V. vinifera sativa*, est souvent confondue avec la forme sauvage, *V. vinifera sylvestris*. Ce groupe a connu deux centres de diversification naturelle, l'Asie moyenne (Iran, Afghanistan) et la Méditerranée. Les vignes d'Asie orientale comprennent plus de 20 espèces qui, à quelques exceptions près, ne présentent que peu d'aptitudes uvifères (Reynier, 2007). La grave crise du phylloxera, qui date de la fin du 19<sup>e</sup> siècle, a entraîné des pertes considérables dans les vignobles européens. Cependant, grâce au greffage sur des porte-greffes américains résistants au phylloxéra, la sauvegarde des vignes européennes a été réussie. Les variétés de vigne sont désignées par le nom de cépage. Parmi les vignes en production en France, on dénombre une cinquantaine de cépages principaux. L'identification des cépages est basée sur l'observation de caractères morphologiques tels que la couleur des bourgeons, la forme des feuilles ou la couleur des raisins.

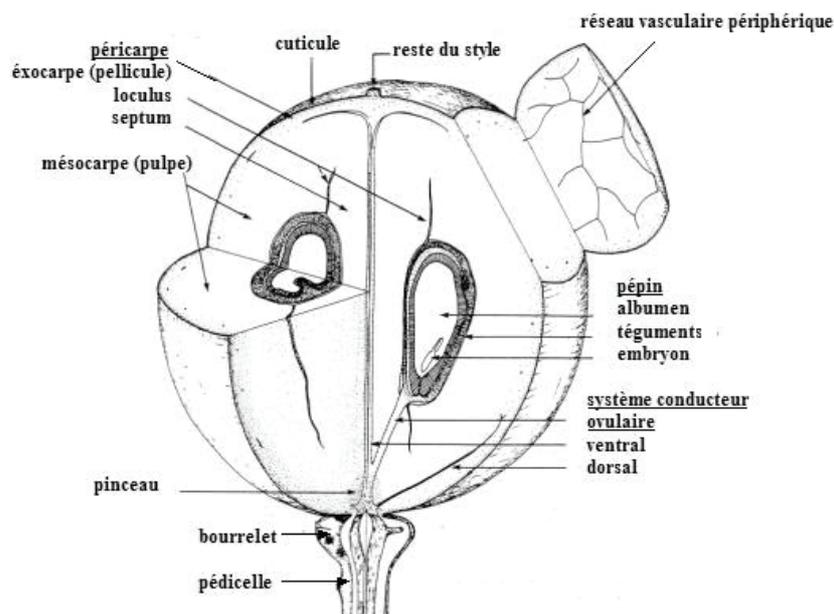
## 2. LA BAIE DE RAISIN

### 2.1. Morphologie

Le fruit de la vigne est une baie à péricarpe entièrement charnu contenant des pépins (Figure 1). Le péricarpe se compose d'un exocarpe appelé pellicule et d'un mésocarpe appelé pulpe. La pellicule est l'enveloppe du raisin. Elle est constituée d'une cuticule (formée de cires lipidiques), de l'épiderme (8 à 10 couches de cellules isodiamétriques de 6,5 à 10  $\mu\text{m}$  de largeur) et de l'hypoderme (10 à 12 couches de cellules de 100 à 250  $\mu\text{m}$  de largeur),

renfermant des substances colorantes et odorantes (Alleweldt *et al.*, 1981, Fougère-Rifot *et al.*, 1996).

La pulpe est la partie la plus importante en volume du raisin, représentant 90 à 95% du poids du raisin, à maturité. Elle est constituée de 25 à 30 couches de cellules parenchymateuses du mésocarpe (Carmona *et al.*, 2008) qui s'agrandissent pour atteindre une taille de 400  $\mu\text{m}$  à la fin du stade de maturation (Carbonneau *et al.*, 2007). Ces cellules possèdent des vacuoles représentant 99% de leur volume, remplies majoritairement d'une solution aqueuse de sucre, de matières azotées et pectiques, d'acides organiques et de matières minérales (Diakou et Carde, 2001). Dès la véraison, leurs parois fines subissent des changements structuraux importants qui sont à l'origine du ramollissement de la baie et de sa plus grande plasticité (Barnavon *et al.*, 2000, Ojeda *et al.*, 2001, Nunan *et al.*, 2001). Le mésocarpe comprend aussi un endocarpe constitué par une fine couche de cellules délimitant les loges carpellaires qui contiennent les pépins (Carmona *et al.*, 2008). Les pépins sont constitués d'un embryon, d'un albumen et de teguments et sont riches en lipides et en phénols (Winkler *et al.*, 1974). Le nombre de pépins dans une baie peut varier de 1 à 4, et la taille ainsi que le poids de la baie augmentent avec le nombre de pépins (Huglin et Schneider, 1998).

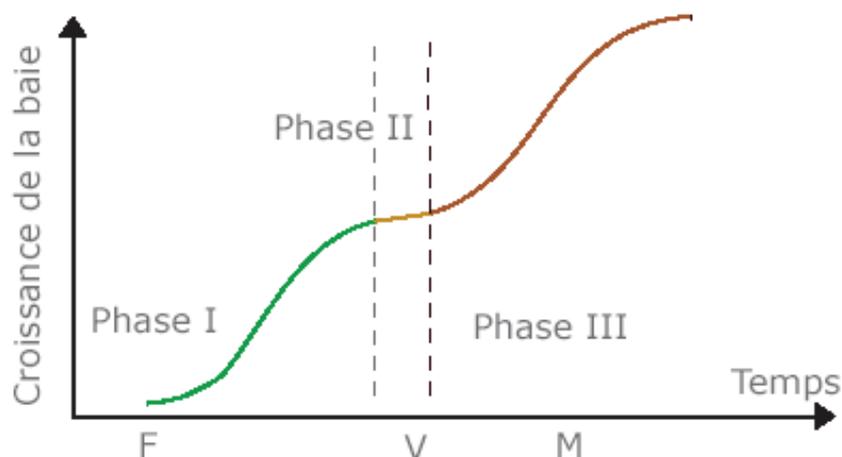


**Figure 1.** Schéma d'une baie de raisin (d'après Coombe, 1987)

## 2.2. Développement

La croissance de la baie se caractérise par une évolution du poids et du volume suivant une courbe en deux étapes de croissance de type sigmoïde (Coombe, 1976). La croissance de la baie de raisin comporte deux phases de croissance successives appelées croissance herbacée

et maturation du raisin et séparées par une phase d'arrêt ou de ralentissement de croissance (Champagnol *et al.*, 1984 ; Reynier *et al.*, 2007) (Figure 2).

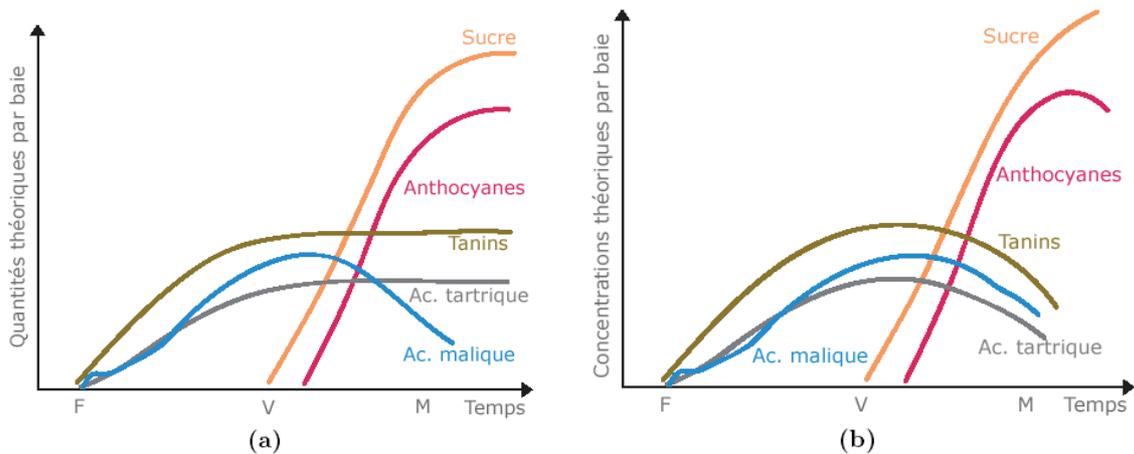


**Figure 2.** *Etapes de la croissance d'une baie de raisin. F) Floraison V) Véraison M) Maturation (Champagnol et al., 1984 ; Reynier et al., 2007)*

La phase I ou phase de croissance herbacée se caractérise par une intense activité métabolique. Une importante multiplication cellulaire a lieu au début de cette phase et s'étale sur 8 à 10 jours après le début du gonflement de l'ovaire (Coombe, 1973). Après cette multiplication cellulaire, le nombre total de cellules par baie est fixé très rapidement et la croissance de la baie est essentiellement due à un grandissement cellulaire durant environ 40 à 50 jours. Une respiration intense ainsi qu'une accumulation rapide d'acides organiques et d'eau dans les vacuoles ont ensuite lieu (Figure 3). Cette accumulation se déroule à un pH vacuolaire constant et extrêmement acide de l'ordre de 2,5 (Hrazdina *et al.*, 1984). Cette acidité est liée à l'accumulation de deux acides, l'acide tartrique qui s'accumule essentiellement au début de la phase I, et l'acide malique qui s'accumule vers la fin de la phase I, avec un taux de synthèse maximal juste avant la véraison (Kliwer, 1966; Conde *et al.*, 2007). D'autres acides organiques tels que l'acide citrique ou encore l'acide succinique sont présents en quantité infime dans la baie de raisin mais sont impliqués dans les qualités organoleptiques des vins (Conde *et al.*, 2007). La chlorophylle est le pigment prédominant. La production de sucres résultant de l'activité de photosynthèse durant la phase herbacée et le saccharose importé par les jeunes baies couvrent leurs besoins métaboliques et leurs réactions biochimiques (Reynier, 2007). La régulation hormonale durant cette phase se fait grâce à des hormones de développement telles que les auxines, les cytokinines et les gibbérellines (Symons *et al.*, 2006 , Conde *et al.*, 2007). Les tanins sont également synthétisés aux stades de développement précoces (Kennedy *et al.*, 2001, Downey *et al.*, 2003, Bogs *et al.*, 2005) et s'accumulent dans les baies jusqu'à la véraison (Kennedy *et al.*, 2001, Downey *et al.*, 2003; Verries *et al.*, 2008).

A la phase herbacée succède une courte phase stationnaire ou phase de ralentissement de la croissance (phase II) de 8 à 12 jours environ, pendant laquelle les pépins commencent à changer de couleur (brunissement), et qui s'achève par la véraison (Ristic et Iland, 2005). Les mécanismes hormonaux impliqués dans cette phase de transition sont peu connus, le raisin étant un fruit classifié comme non-climactérique dont la maturation serait indépendante de l'éthylène. Cependant, Chervin *et al.*, 2004 et El-Kereamy *et al.*, 2003 ont montré que l'éthylène était capable d'induire des changements importants dans la maturation des baies de raisin en démontrant son effet sur l'augmentation d'accumulation des anthocyanes. La véraison a lieu environ 60 jours après la floraison (Huglin et Schneider, 1998, Coombe et McCarthy, 2000). C'est une étape clé, caractérisée par un ramollissement très rapide de la baie (environ 24h), visible chez les cépages colorés par la pigmentation progressive des baies de raisin, et la translucidité de la pellicule chez les cépages blancs (Huglin et Schneider, 1998, Carmona *et al.*, 2008). La phase II est rarement considérée comme une phase de développement à part entière, mais semble plutôt correspondre à la fin de la phase I, et sera considérée comme telle par la suite.

La Phase III correspond à la maturation proprement dite. La croissance cellulaire reprend et s'accompagne de diverses modifications physiologiques. La baie double de volume durant cette période. Cette expansion cellulaire est permise par l'activité de plusieurs enzymes de modification des parois cellulaires, telles que les expansines ou les pectines méthylestérases (Barnavon *et al.*, 2000, Schlosser *et al.*, 2008). Durant cette phase, l'importante distension ou expansion des cellules du mésocarpe résulte essentiellement de l'accumulation d'eau et de sucres dans les baies (Huglin et Schneider, 1998). Les sucres accumulés en grande quantité (jusqu'à plus d'1M de concentration) sont des hexoses notamment le fructose et le glucose, qui résultent du clivage par les invertases (pariétales, cytoplasmiques ou vacuolaires) du saccharose importé (Conde *et al.*, 2007, Reynier, 2007) (Figure 3). Par ailleurs l'acidité de la baie de raisin diminue suite à la chute de la concentration en malate, la quantité de tartrate restant constante par baie et le pH vacuolaire atteint environ 3,5 à la maturité. Les pépins peuvent perdre un peu de poids au cours de cette phase, suite à la dessiccation des téguments externes (Ristic et Iland, 2005). La pellicule se charge en produits secondaires d'une importance œnologique majeure: les composés d'arômes et leurs précurseurs et des pigments phénoliques (anthocyanes pour les cépages rouges et flavonols). Le développement de ces caractéristiques est essentiel dans la qualité du produit final. La fin de la maturation du fruit est atteinte environ 120 jours après la floraison (Carbonneau *et al.*, 2007).



**Figure 3.** Schéma de l'évolution des principaux constituants au cours de la maturation de la baie de raisin a) en quantité par baie b) en concentration (Geraudie, 2009)

### 3. LES COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN

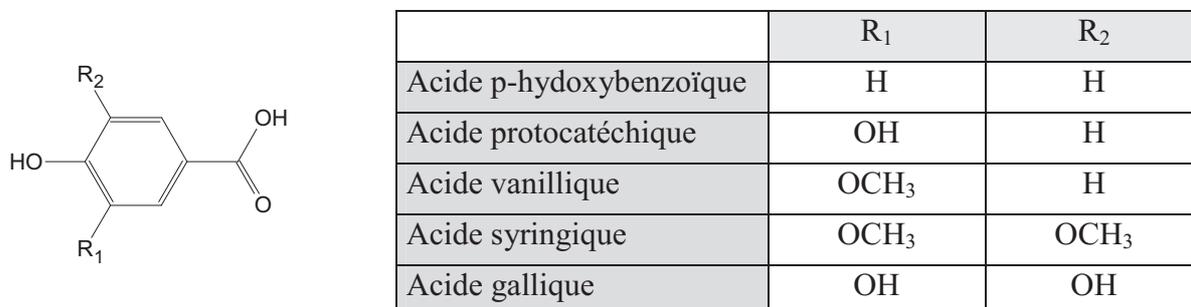
Dans le règne végétal, les composés phénoliques sont présents dès les Ptéridophytes (premières plantes vasculaires) et ils jouent des rôles essentiels pour la survie des végétaux en milieu terrestre en intervenant dans leur port dressé, leur défense, ou encore leur reproduction.

Les composés phénoliques sont des composés importants présentant une grande diversité de structures. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, qui peuvent être méthylés, acylés ou glycosylés. Ainsi, ils constituent une vaste famille de métabolites secondaires comprenant plusieurs groupes, contenant chacun quelques dizaines à plusieurs milliers de molécules différentes. Parmi les composés phénoliques, on distingue classiquement des composés non flavonoïdes et des composés flavonoïdes basés sur un squelette en C6-C3-C6 (Singleton et Esau, 1969). Dans le raisin, les premiers sont principalement représentés par les stilbènes et les acides phénols qui comprennent les acides benzoïques et les acides hydroxycinnamiques et les seconds par les anthocyanes, les flavan-3-ols et, dans une moindre mesure, les flavonols. Les flavonoïdes ont une importance majeure chez la vigne, car ils contribuent à la qualité organoleptique de la baie de raisin et des produits dérivés, vins et jus de raisin. Ainsi, alors que les acides phénols et les stilbènes ne seront que rapidement abordés, cette introduction détaillera les composés phénoliques majoritairement accumulés dans la baie de raisin au cours de son développement, les flavonoïdes et plus particulièrement les flavan-3-ols.

#### 3.1. Les acides phénoliques

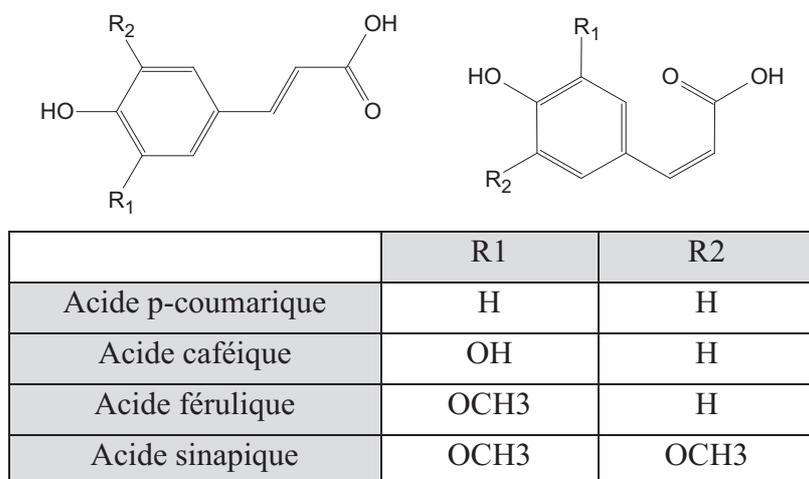
**Les acides hydroxybenzoïques** (gallique, salicylique, vanillique,...) sont constitués d'un squelette à sept carbones (C6-C1, Figure 4) et dérivent de l'acide benzoïque. Ces acides sont

parmi les formes phénoliques les plus simples, répandues aussi bien chez les gymnospermes que chez les angiospermes. L'acide gallique est l'acide hydroxybenzoïque majoritaire chez le raisin où on le rencontre sous forme libre, sous forme de glucoside et comme substituant des flavan-3-ols.



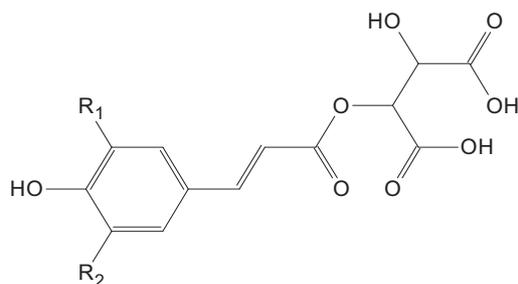
**Figure 4.** Structures de divers acides hydroxybenzoïques

**Les acides hydroxycinnamiques** dérivent de l'acide cinnamique, et présentent un squelette carboné de type C6-C3 (Figure 5). On les trouve principalement sous forme *trans* mais les isomères *cis* existent aussi.



**Figure 5.** Structure des principaux acides hydroxycinnamiques du raisin, représentés sous forme *trans* (à gauche) et *cis* (à droite).

Du fait de leur toxicité potentielle pour les cellules végétales, les acides hydroxycinnamiques sont souvent complexés à diverses molécules. Les acides hydroxycinnamiques existent généralement dans la plante sous forme de glucosides, ou sous forme d'esters. Dans le raisin, ils sont principalement rencontrés sous forme d'esters tartriques : les acides caféoyltartrique (caftarique), *p*-coumaroyltartrique (coutarique) et feruloyltartrique (fertarique) (Figure 6), les formes prédominantes étant les isomères *trans*. (Ribéreau-Gayon, 1965; Singleton et al., 1978).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Acide trans-coutarique	H	H
Acide trans-caftarique	OH	H
Acide trans-fertarique	OCH <sub>3</sub>	H

**Figure 6.** Structures chimiques des principaux esters hydroxycinnamiques présents dans le raisin

Les acides phénoliques sont des composés qui ont des propriétés antioxydantes pouvant contribuer à prévenir l'apparition de plusieurs maladies (cancers, maladies cardiovasculaires et maladies liées au vieillissement) en neutralisant les radicaux libres de l'organisme (Cole 1986, Andary 1986).

Les rôles des acides phénols dans la plante sont divers. Ils interviennent comme substrats en amont des voies de biosynthèse des flavonoïdes et des lignines et sont impliqués dans les processus physiologiques tels que la germination, la floraison ou la croissance (Weidner *et al.*, 1996) ainsi que dans la régulation de la voie de biosynthèse des composés phénoliques (Loake *et al.*, 1991, Blount *et al.*, 2000). On leur attribue une fonction antioxydante permettant de réguler la sénescence cellulaire. Chez les céréales, ils exercent une fonction de «ciment» intercellulaire, engendrant une association étroite entre les polysaccharides tels que les arabinoxylanes, et d'autres molécules non osidiques comme les lignines (Iiyama *et al.*, 1994), ou encore les pectines entre elles ou à d'autres polysaccharides. De telles interactions pourraient contribuer à «compacter» le réseau par un maillage resserré au niveau des parois du péricarpe (Chesson *et al.*, 1997). De plus, elles seraient impliquées dans l'adhésion des cellules entre elles (Waldron *et al.*, 1997) et entre les couches cellulaires (Peyron, 2002).

Les acides phénoliques pourraient également agir comme des facteurs de croissance régulant les divisions et l'expansion cellulaires. Ainsi, parmi les acides phénoliques, l'acide salicylique (*m*-hydroxybenzoïque) est une molécule «signal» indispensable à la mise en place de la résistance systémique acquise chez le tabac et le concombre (*Cucumis sativus*) par exemple, en réponse à de nombreux pathogènes (Yalpani *et al.*, 1993, Lee *et al.*, 1995).

Les acides phénoliques protègent également les plantes des rayons UV. Ainsi le sinapoylmalate, ester d'acide sinapique avec l'acide malique, a été démontré être impliqué

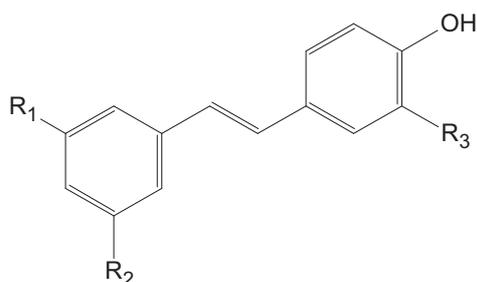
dans la protection contre les effets délétères du rayonnement UV-B dans les feuilles d'arabidopsis (Landry *et al.*, 1995, Booij- James *et al.*, 2000, Meißner *et al.*, 2008).

La composition de la baie en acides hydroxycinnamiques dépend de l'espèce et du cultivar et également de la saison, de la maturité et du lieu de culture (Boursiquot JM *et al.*, 1986, Singleton *et al.*, 1986). On les trouve dans les vacuoles des cellules de la pulpe ou de la pellicule sous forme d'esters tartriques (Ribéreau-Gayon, 1965), mais ils peuvent également se lier au glucose (Ong et Nagel, 1978), ainsi qu'aux polyamines (Geny *et al.*, 1997). Ils sont impliqués dans les réactions de brunissement enzymatique et ils sont connus comme des précurseurs de phénols volatils (Licker *et al.*, 1999). Les acides hydroxycinnamiques s'accumulent au cours de la période initiale de croissance de la baie, avec un pic d'accumulation des esters hydroxycinnamiques avant la véraison dans les cellules du mésocarpe (Romeyer *et al.*, 1983). La quantité d'esters hydroxycinnamiques par baie se stabilise ensuite jusqu'à la maturité de la baie.

### 3.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont présents chez les Pinacées, les Fagacées, les Liliacées et les Vitacées (Bavaresco et Frigoni, 2001). Ce sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison formant un système conjugué. Ils sont de type C6-C2-C6 (Figure 7). Les stilbènes existent sous leur forme aglycone comme le resvératrol (isomères *trans* et *cis*), qui est le principal stilbène chez la vigne, ou encore sous leur forme glycosylée (picéïdes), ou méthylée (ptérostilbènes). Le resvératrol peut également former des oligomères, tels que les viniférines (Jeandet *et al.*, 2002; Waterhouse, 2002 ; Waterhouse, 1994 ; Langcake, 1981).

Les stilbènes jouent un rôle de phytoalexine antifongique (Bais *et al.*, 2000). Ils sont synthétisés dans les feuilles de vigne, ainsi que dans des organes lignifiés (tige, pépins, racines,...) de façon constitutive (Bavaresco et Frigoni, 2001; Jeandet *et al.*, 2002) ou en réponse à des attaques fongiques, principalement dues à *Botrytis cinerea* (responsable de la pourriture grise), *Plasmopara viticola* (responsable du mildiou), ou encore *Erysiphe necator* (responsable de l'oïdium). Ils sont aussi présents, en concentration infime, dans les baies saines (Bavaresco et Frigoni, 2001). Les stilbènes sont aussi synthétisés en réponse à des stress abiotiques tels que le rayonnement UV, avec une réponse rapide dans les baies tout au long des stades de développement (Bais *et al.*, 2000; Versari *et al.*, 2001). Dans la baie, les stilbènes sont essentiellement localisés dans la pellicule, et beaucoup plus faiblement dans la pulpe, après la véraison (Gatto *et al.*, 2008).



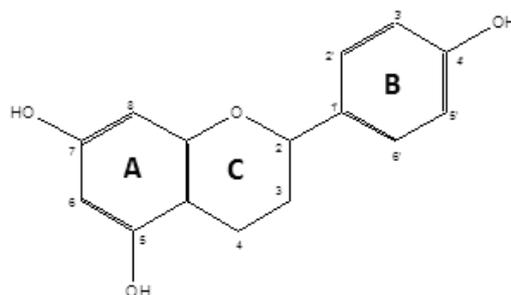
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<i>trans</i> -resvératrol	OH	OH	H
<i>trans</i> -picéatanol	OH	OH	OH
<i>trans</i> -picéide	O-glucoside	OH	H
<i>trans</i> -ptérostilbène	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	

**Figure 7.** Structure chimique de quelques stilbènes présents dans le raisin

### 3.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, comprenant au moins 6000 molécules, sont des composés phénoliques présents chez toutes les plantes vasculaires et la plupart des Bryophytes. Ils sont formés d'un squelette de base à 15 atomes de carbones organisés dans une structure générale de type C6-C3-C6 (Figure 8). Le cycle A, substitué en 5 et en 7 par des groupements hydroxyles, est appelé noyau phloroglucinol. Le cycle B porte toujours un hydroxyle en 4' (noyau *p*-phénol) et souvent un hydroxyle supplémentaire en 3' (noyau catéchol) ou deux en 3' et 5' (noyau pyrogallol). Le cycle C (C3) est un cycle pyrane. Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes qui se distinguent par le niveau d'oxydation et les positions des substituants de leur hétérocycle central (flavan-3-ols, flavan-4-ols, flavan-3,4-diols, flavones, flavonols dihydroflavones, dihydroflavonols, anthocyanes, isoflavonoïdes, aurones, chalcones...). Les principales familles rencontrées dans le raisin sont les flavan-3-ols, les flavonols et les anthocyanes mais des dihydroflavonols ont également été identifiés. Par ailleurs, les dihydroflavones et les flavan-3,4 diols sont des intermédiaires dans les voies de biosynthèse de ces molécules.

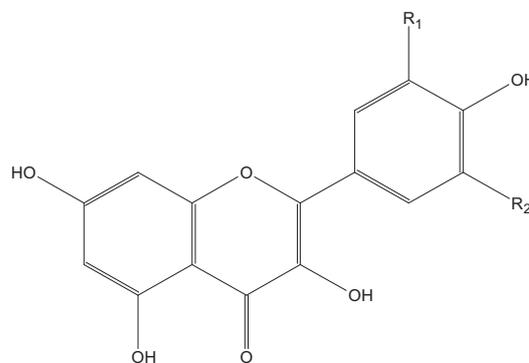
Chacune de ces familles comprend une diversité de molécules, du fait de la substitution du cycle B par des hydroxyles supplémentaires (3', 5'), de la méthylation de ces hydroxyles, de la glycosylation des groupements hydroxyles (en 3 et plus rarement en 5) ou encore de l'acylation (sur l'hydroxyle en 3 dans la famille des flavan-3-ols, ou le 6' du glucose dans celle des anthocyanes). Enfin, les flavan-3-ols existent à l'état de monomères mais sont principalement présents sous forme d'oligomères et de polymères, appelés proanthocyanidines ou tanins condensés.



**Figure 8.** Squelette carboné des flavonoïdes et numérotation adoptée

### 3.3.1. Les flavonols

Les flavonols sont des composés jaune clair. Dans le raisin, ils se trouvent en quantité très inférieure aux flavan-3-ols et aux anthocyanes (Downey *et al.*, 2003). A maturité, dans les cépages rouges, on détecte majoritairement la quercétine (44%), la myricétine (37%) et en plus faible quantité le kaempférol, la laricitrine, l'isorhamnétine et la syringétine (Mattivi *et al.*, 2006) (Figure 9). Dans les cépages blancs, on trouve principalement de la quercétine (81%) et du kaempférol (17%) et en plus faible quantité l'isorhamnétine (Mattivi *et al.*, 2006) et la myricétine (Talcott et Lee, 2002). Les flavonols s'accumulent principalement sous forme glycosylée, les flavonols majoritaires étant la quercétine 3-O-glucoside et la quercétine 3-O-glucuronide (Ribéreau-Gayon, 1964; Wulf et Nagel, 1976, Cheynier et Rigaud, 1986; Price *et al.*, 1995; Downey *et al.*, 2003b).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
kaempférol	H	H
quercétine (ou quercétol)	OH	H
myricétine(ou myricétol)	OH	OH
isorhamnétine (ou isorhamnétol)	OCH <sub>3</sub>	H
laricitrine	OCH <sub>3</sub>	OH
syringétine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Figure 9.** Structures chimiques de quelques flavonols présents dans le raisin.

Au cours du développement de la baie, la synthèse des flavonols s'effectue à deux moments. Une phase de synthèse précoce a lieu dans les inflorescences, où les flavonols contribueraient à la fertilité du pollen. La deuxième phase de synthèse a lieu dans la baie après véraison, avec une nette accumulation des flavonols totaux (mg/baie) 3 à 4 semaines après véraison, alors que la synthèse des anthocyanes a déjà débuté (Downey *et al.*, 2003a). Leur synthèse est accrue notamment en réponse à l'exposition au rayonnement UV (Price *et al.*, 1995, Spayd *et al.*, 2002 ; Downey *et al.*, 2004; Cortell et Kennedy, 2006).

Les flavonols sont uniquement synthétisés dans l'assise épidermique supérieure de la pellicule de la baie. Les glucosides de kaempférol peuvent aussi s'accumuler dans les inflorescences (Downey *et al.*, 2003a). On retrouve également les flavonols dans les organes végétatifs tels que les feuilles, les vrilles, la tige ou encore les bourgeons (Downey *et al.*, 2003a).

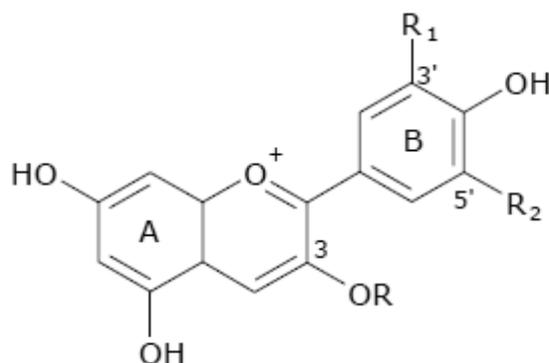
### 3.3.2. *Les Anthocyanes*

Les anthocyanes sont les pigments des raisins roses, rouges ou noirs, généralement représentés sous leur forme cation flavylum (2-phénylbenzopyrylium) rouge. Elles sont présentes sous forme de glucosides, éventuellement substitués. L'aglycone de l'anthocyane est appelé anthocyanidine. Chez les plantes, Harborne et Williams (2001) ont rapporté au moins 400 molécules différentes dérivant de 18 structures d'anthocyanidines. Leurs structures se différencient par le nombre et la position de groupes hydroxyles et méthyles sur le noyau B. Les anthocyanidines sont le plus souvent glycosylées en position 3 et 5 avec le plus fréquemment des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) et des di- et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents (Brouillard, 1993). La glycosylation et la méthylation de ces aglycones participent à la stabilisation des anthocyanes en les protégeant de l'oxydation. Les sucres peuvent aussi être acylés par les acides cinnamique, *p*-coumarique, acétique, caféique, ferulique, sinapique et malonique, augmentant ainsi la diversité de ces molécules (Brouillard, 1993). La principale caractéristique des anthocyanes est leur diversité de couleur allant du bleu, au rouge, mauve, rose et orange (Waterhouse, 2002; Kong *et al.*, 2003; Macheix *et al.*, 2005; Grotewold, 2006; Tanaka *et al.*, 2008).

Chez le raisin, les anthocyanes dérivent principalement de cinq anthocyanidines : la malvidine, la péonidine, la pétunidine, la cyanidine et la delphinine mais des dérivés de pelargonidine ont été détectés dans les cépages teinturiers. Les anthocyanidines instables sont glycosylées en position 3 (en C3 et plus rarement en C3 et C5) pour former des anthocyanes (Figure 10). Ces anthocyanes peuvent être ensuite substitués par des acides aromatiques (acide *p*-coumarique ou caféique) ou aliphatiques (acide acétique). La proportion des

différentes formes d'anthocyanes est une caractéristique variétale et peut être utilisée comme critère taxonomique (Roggero *et al.*, 1988). Ainsi, les raisins des cépages de type Pinot ne contiennent pas d'anthocyanes acylées (Fong *et al.*, 1971), ceux de Gamay possèdent très peu d'acétylées, mais renferment des coumaroylées, les baies de Syrah sont riches dans tous les types d'anthocyanes et celles de cépages de type Muscat contiennent moins de dérivés malvidine que les autres cépages (Cravero *et al.*, 1994). Néanmoins, la malvidine 3-O-glucoside reste l'anthocyane majoritaire dans le raisin. Leurs teneurs sont modulées par de nombreux facteurs comme la température (Mori *et al.*, 2005), le stress hydrique (Roby *et al.*, 2004; Koundouras *et al.*, 2007), les régulateurs de croissance (Pirie et Mullins, 1976; Hiratsuka *et al.*, 2001a ; Delgado *et al.*, 2004) et les apports en nutriments.

Dans la baie de raisin, les anthocyanes ne sont détectées que dans la vacuole des pellicules des cépages colorés (sauf pour les cépages teinturiers), et constituent 20 à 40 % de la fraction totale des polyphénols (Boss *et al.*, 1996; Gagné *et al.*, 2006). Leur accumulation débute à partir de la véraison. Une stabilisation, voire une légère diminution des teneurs est observée à maturité (Boss *et al.*, 1996).



Anthocyanidines R* = H	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Malvidine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Péonidine	OCH <sub>3</sub>	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH <sub>3</sub>	OH
Cyanidine	OH	H

\* : Forme monoglucoside, R=glucoside

**Figure 10.** Principales anthocyanes présentes dans la baie de raisin.

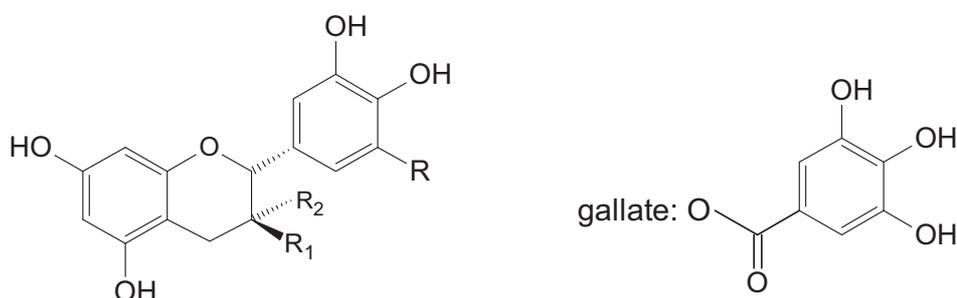
### 3.3.3. Les flavan 3-ols

Les flavan-3-ols se caractérisent par leur hétérocycle central C saturé substitué en 3 par un hydroxyle.

La présence de deux carbones asymétriques, en C2 et C3, ouvre la possibilité de 4 stéréoisomères, parmi lesquels les plus répandus et les seuls décrits à ce jour dans le raisin sont les configurations 2R, rencontrées sous forme 2,3 *trans* (2R, 3S) et 2,3 *cis* (2R, 3R), ces dernières étant désignées par le préfixe épi. Dans le raisin, deux groupes de monomères, (épi)catéchine et (épi)gallocatechine, dont les noyaux B portent respectivement deux (en 3' et 4') et trois (en 3', 4' et 5') hydroxyles, sont présents. De plus, ces monomères peuvent être acylés en position 3 par l'acide gallique. Il n'existe pas de forme glycosylée des flavan-3-ols, contrairement aux autres flavonoïdes, chez le raisin.

Ainsi, les cinq principaux monomères du raisin sont (Figure 11):

- (+)-catéchine
- (-)-épicatéchine
- (+)-gallocatechine
- (-)-épigallocatechine
- (-)-épicatéchine-3-gallate.



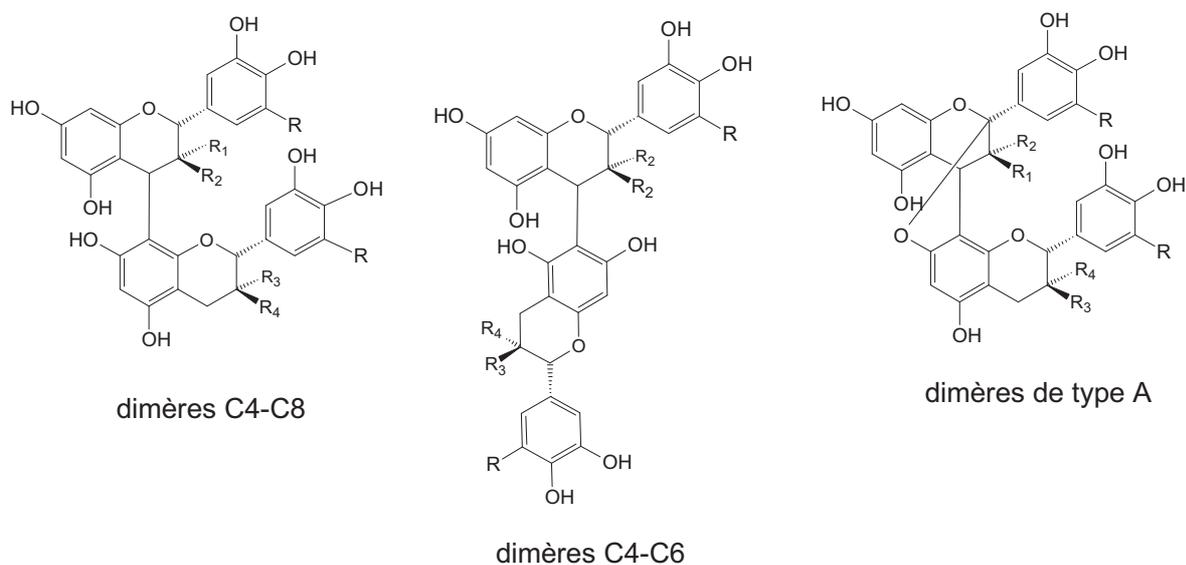
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R
(+)-catéchine	OH	H	H
(-)-épicatéchine	H	OH	H
(-)-épicatéchine 3-gallate	H	gallate	H
(+)-gallocatechine	OH	H	OH
(-)-épigallocatechine	H	OH	OH

**Figure 11.** Structure des flavan-3-ols monomères du raisin

Les flavan-3-ols, dans le raisin, se rencontrent majoritairement sous la forme d'oligomères et polymères, qui sont les tanins condensés, également nommés proanthocyanidines (PAs) ou encore tanins catéchiques. Le terme de tanins fait référence à la capacité de ces molécules à précipiter les protéines. Par ailleurs, elles doivent leur nom de proanthocyanidines à leur

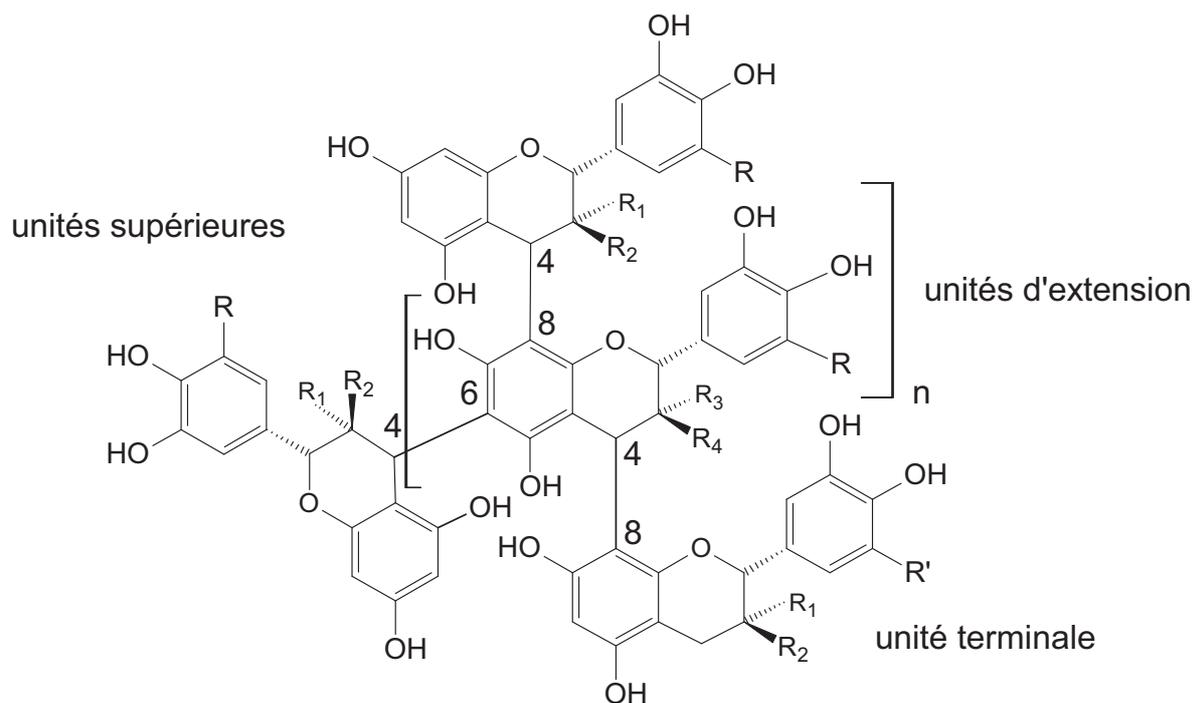
capacité à générer des anthocyanidines après hydrolyse acide (Bate-Smith *et al.*, 1954; Porter *et al.*, 1986). Dans le raisin, on distingue deux types de proanthocyanidines suivant la nature de l'anthocyanidine libérée. D'une part, les procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), libèrent de la cyanidine; d'autre part, les prodelfphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine), libèrent de la delphinidine (Hemingway et McGraw, 1983).

Les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unités monomériques et le type de liaison les reliant entre elles. Ainsi, une trentaine de proanthocyanidines dimériques (Figure 12), trimériques et tétramériques ont été identifiées (Ribéreau- Gayon, 1964; Weinges et Pretti, 1971; Czochanska *et al.*, 1979; Cheynier et Rigaud, 1986; Boukharta *et al.*, 1988; Ricardo-da-Silva *et al.*, 1991 ; Escribano-Bailon *et al.*, 1995). Le type B se caractérise par une liaison intermonomérique (liaison interflavane) qui peut être soit C4-C8 soit C4-C6, de conformation *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C-3; les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C-2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A (Figure 12). La présence de procyanidine A2 a été signalée dans le raisin (Salagoity-Auguste, 1984) mais elle n'y a pas été formellement identifiée.



**Figure 12.** Structures chimiques des proanthocyanidines dimères de type B et de type A.

La Figure 13 représente la structure d'un tanin condensé polymérique. On y distingue les unités supérieures, les unités intermédiaires (ou unités d'extension) et l'unité inférieure. On note chez le raisin la prédominance des formes 2,3 *cis* (épicatéchine, galloylée ou non, et épigallocatéchine) dans les unités supérieures et intermédiaires (Souquet *et al.*, 1996). Le nombre moyen d'unités monomériques est défini comme le degré moyen de polymérisation (DPM).



**Figure 13.** Structure des proanthocyanidines polymères (procyanidine, si  $R=H$ , et/ou prodelphinidine, si  $R=OH$ ) suivant la nature des unités supérieures et intermédiaires;  $R_1=H, OH$ ;  $R_2=H, OH, O\text{-gallate}$

### 3.3.3.1. Cinétique d'accumulation, localisation et compartimentation des flavanols dans la baie

Dans le raisin, les flavan-3-ols sont présents dans divers tissus et organes végétatifs et reproductifs, notamment dans le bois (Boukharta *et al.*, 1988), les feuilles (Bogs *et al.*, 2005; Tesnière *et al.*, 2006), les tiges (Souquet *et al.*, 2000), les inflorescences et les fruits (Bogs *et al.*, 2005). Au sein de la baie, les flavan-3-ols sont particulièrement abondant dans les pépins et la pellicule.

Les proanthocyanidines des pépins sont des procyanidines, basées sur les sous-unités (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et (-)-épicatéchine 3-gallate (Prieur *et al.*, 1994), avec des degrés de polymérisation moyens allant de 3 (Mané *et al.*, 2007) à 16 (Cheynier *et al.*, 1998), selon les variétés de raisin, et des taux de galloylation de 10 à 20%, pouvant atteindre 23% pour certains cépages (Verriès *et al.*, 2008). Les procyanidines des pépins, constituées à plus de 60% d'épicatéchine, s'accumulent dans les cellules endothéliales des téguments (Downey *et al.*, 2003; Gagné *et al.*, 2006). Leur quantité varie selon les cépages. Les flavan-3-ols sont essentiellement synthétisés dès la formation des pépins, et atteignent une quantité maximum environ 2 semaines après la véraison (Downey *et al.*, 2003; Bogs *et al.*, 2005). Ensuite, lorsque les pépins brunissent et que leur teneur en eau diminue, la quantité de PAs extractibles diminue également, ce qui résulte probablement de la complexation des PAs avec d'autres

composés. Par ailleurs, au cours de la maturation, les PAs pourraient subir également des réactions d'oxydation (Kennedy *et al.*, 2000a et b; Downey *et al.*, 2003; Bogs *et al.*, 2005), par exemple sous l'effet d'une laccase, comme cela a été décrit dans les graines d'*A. thaliana*, (Pourcel *et al.*, 2005).

Au sein de la pellicule, les unités d'élongation des proanthocyanidines sont majoritairement constituées de (-)-épicatéchine, (-)-épigallocatechine et en moindre quantité de (-)-épicatéchine 3-gallate. Les unités terminales sont plutôt des (+)-catéchines (Souquet *et al.*, 1996; Downey *et al.*, 2003b), et en plus faible proportion des (-)-épicatéchines. Les proanthocyanidines des pellicules présentent des degrés de polymérisation aux alentours de 20-30 pouvant atteindre des valeurs supérieures à 50 pour certains cépages (Monagas *et al.*, 2003, Souquet *et al.*, 2006) et des taux de galloylation inférieurs à 5% (Souquet *et al.*, 1996). La synthèse des tanins condensés dans la pellicule a uniquement lieu durant quelques semaines après la floraison (Kennedy *et al.*, 2001; Downey *et al.*, 2003). Après la véraison, la quantité de PAs se stabilise et aucun changement qualitatif n'est mesuré durant cette période (Fournand *et al.*, 2006). Certains auteurs ont noté une diminution de la teneur en flavan-3-ols monomères et en proanthocyanidines après la véraison (Downey *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2002), et une augmentation concomitante (Kennedy *et al.*, 2001) ou une diminution (Downey *et al.*, 2003) du DPM des proanthocyanidines. Toutefois, cette perte apparente des PAs peut être due à une diminution du taux d'extraction liée à l'adsorption accrue des PAs sur les parois cellulaires (Kennedy *et al.*, 2001; Downey *et al.*, 2003; Marles *et al.*, 2003; Bindon *et al.*, 2010), ou à la conversion *in vivo* des PAs, par oxydation (Kennedy *et al.*, 2000 a et b; Downey *et al.*, 2003; Bogs *et al.*, 2005) catalysée pour former de nouveaux produits difficiles à analyser, comme ce serait le cas chez *Arabidopsis thaliana* (Pourcel *et al.*, 2005). Les proanthocyanidines de la pulpe (Mané *et al.*, 2007; Verries *et al.*, 2008), des rafles (Souquet *et al.*, 2000) et des feuilles (Tesnière *et al.*, 2006) sont aussi des polymères mixtes de procyanidines et de prodelphinidines.

### **3.3.4. Rôle des flavonoïdes**

#### *3.3.4.1. Pour la plante*

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau des fleurs, des fruits, des feuilles et des graines d'un grand nombre de végétaux. Leur accumulation confère des avantages écologiques et physiologiques majeurs (Koes *et al.*, 1994; Harborne et Williams, 2000; Winkel-Shirley, 2002; Dixon *et al.*, 2005). Cette accumulation peut être induite par divers agents biotiques ou abiotiques. Ils assurent en premier lieu une protection contre un éventail de stress abiotiques. En effet, les flavones, les flavonols, de même que les anthocyanes, sont synthétisés en réponse

aux UV-B dans les cellules épidermiques des feuilles, mais également dans les cires épicuticulaires de ces cellules et les trichomes. Du fait de leur spectre d'absorption dans les UV, les flavonoïdes agissent ainsi comme des filtres, mais ils peuvent aussi agir en se liant directement à l'ADN pour le protéger (Harborne et Williams, 2000; Dixon, 2005; Aron et Kennedy, 2008 ; Lindoo et Caldwell, 1978; Ormrod *et al.*, 1995; Smith et Markham, 1998; Mendez *et al.*, 1999; Pradhan *et al.*, 2008). Certains flavonoïdes sont également synthétisés par les plantes soumises à une carence en minéraux et nutriments (Atkinson, 1973; Hodges et Nozzolillo, 1996; Kumar et Sharma, 1999), ou à des températures froides (Christie *et al.*, 1994; Krol *et al.*, 1995; Close *et al.*, 2001; Kasuga *et al.*, 2008).

D'autre part, les pigments absorbant dans la lumière visible, comme les anthocyanes, les flavonols et les auronés, sont en outre responsables de la coloration du pollen, des fleurs et des fruits (Harborne et Williams, 2000; Tanaka *et al.*, 2008), donc de l'attraction des insectes pollinisateurs et de la dispersion des graines (Faegri et Van der Pijl, 1971; Taylor, 1995; Archetti, 2000; Downey *et al.*, 2006 ; Manetas, 2006 ; Cooley *et al.*, 2008; Rausher, 2008).

Les flavonoïdes, comme les stilbènes, assurent de plus une protection contre un éventail de stress biotiques. Les isoflavonoïdes, les flavanes et les flavanones sont essentiellement synthétisés comme des phytoalexines en réponse à des attaques microbiennes (Hipskind *et al.*, 1996; Ardi *et al.*, 1998), et présentent également des propriétés antibactériennes, antivirales et pesticides (Stone, 1979; Costa-Arbulu *et al.*, 2001). La concentration et la nature des flavonoïdes (notamment les proanthocyanidines) dans les feuilles déterminent leur nature amère et astringente, et influencent ainsi la nutrition des herbivores (Harborne et Williams, 2000; Aron et Kennedy, 2008). Leur activité biologique peut être modifiée par leur décoration. Ainsi la galloylation de catéchines et oligomères de flavanols augmente les propriétés antibactériennes, antivirales et antioxydantes de ces molécules (Kajiya *et al.*, 2001, 2002 ; da Silva Porto *et al.*, 2003)

Enfin, les tanins condensés s'accumulent dans les téguments des semences, jouent un rôle crucial dans la dormance et la germination (Debeaujon *et al.*, 2001). Les flavonoïdes peuvent également conditionner la fertilité du pollen et moduler le transport des auxines (Downey *et al.*, 2006; Peer et Murphy, 2007).

#### 3.3.4.2. *Pour la santé humaine et l'industrie*

En plus de leurs fonctions biologiques chez la plante, les flavonoïdes possèdent une pléthora de propriétés médicinales régulièrement actualisée. En effet, les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques, antifongiques et antibactériennes, mais également spasmolytiques permettant une relaxation des muscles lisses. De plus, en éliminant

les espèces oxygénées telles que les anions superoxydes ( $O^{2-}$ ), ainsi que les radicaux hydroxyles et peroxydes, et en réduisant la peroxydation des lipides, les flavonoïdes jouent un rôle d'antioxydants. D'autre part, les flavonoïdes peuvent agir sur le système vasculaire en limitant l'agrégation des plaquettes, et présentent des propriétés antitumorales par induction de l'apoptose, et par l'inhibition à la fois de la multiplication des cellules carcinogènes et la prolifération des lymphocytes T (Harborne et Williams, 2000; Aron et Kennedy, 2008). Enfin, les flavonoïdes peuvent affecter la stabilité et la fluidité des membranes cellulaires (Harborne et Williams, 2000; Yilmaz et Toledo, 2004; Aron et Kennedy, 2008), permettant en outre de lutter contre les maladies cardiaques coronariennes, en inhibant l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL, Low Density Lipoprotein). De par leurs nombreuses propriétés médicinales, les composés phénoliques naturellement présents dans les végétaux et leurs dérivés présentent donc un intérêt certain et grandissant pour la nutrition humaine, les industries pharmacologiques et cosmétiques.

Les flavonoïdes sont également utilisés en tant que colorants pour les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

#### **4. BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES**

Depuis les années 90, la caractérisation de la voie métabolique des flavonoïdes a beaucoup progressé (Winkel-Shirley, 2001; Vom Endt *et al.*, 2002; Marles *et al.*, 2003; Springob *et al.*, 2003; Schijlen *et al.*, 2004; Dixon *et al.*, 2005; Lepiniec *et al.*, 2006). Les premiers travaux ont été réalisés chez pétunia, maïs et *Antirrhinum majus* (Holton et Cornish, 1995 ; Winkel-Shirley, 2001 ; Mol *et al.*, 1998 ; Winkel-Shirley, 2001 ; Koes *et al.*, 2005). Chez ces végétaux, les gènes codant pour les différentes enzymes de cette voie se sont avérés exprimés dans des tissus de manière spécifique et coordonnée avec la formation des différents composés. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'analyse moléculaire de mutants présentant une pigmentation altérée des téguments (phénotype *transparent testa (tt)*, et *phénotype tannin-deficient seeds (tds)* a permis l'identification de nombreux gènes impliqués dans la voie générale de biosynthèse et de régulation des flavonoïdes (Koornneef, 1981; Koornneef, 1990 ; Shirley *et al.*, 1995; Abrahams *et al.*, 2002; Lepiniec *et al.*, 2006).

##### **4.1. Les enzymes de la voie : Description des gènes structuraux et expression durant le développement chez le raisin**

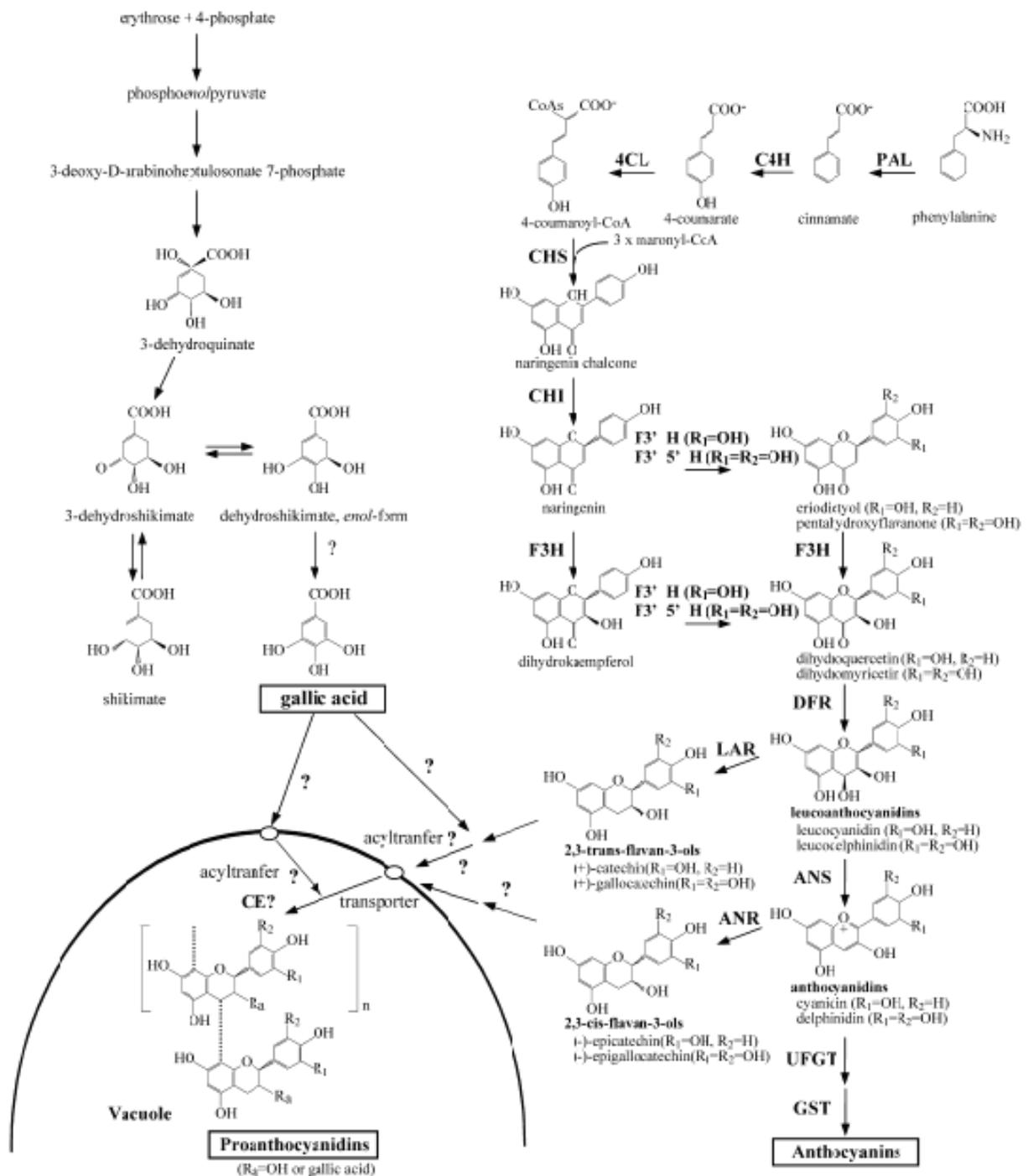
De nombreux auteurs séparent en deux groupes les enzymes impliquées dans la voie métabolique des flavonoïdes. Le premier groupe constitue la partie amont de la voie, commune aux différentes familles de flavonoïdes; le second groupe comprend les enzymes situées en aval de la voie, pour la plupart spécifiques de certaines familles. Les gènes codant

pour ces enzymes sont désignés respectivement par les termes «gènes de biosynthèse précoces» (EBG, Early Biosynthetic Genes), et «gènes de biosynthèse tardifs» (LBG, Late Biosynthetic Genes). Les voies de biosynthèse des principaux flavonoïdes de la baie de raisin sont présentées dans la Figure 14.

Au cours du développement de la baie, l'expression des gènes structuraux (codant pour les enzymes) n'est pas constitutive, et pour la plupart d'entre eux, le profil d'expression montre des différences avant et après véraison. Cette étape constitue donc un moment clé au cours du développement de la baie. En effet, la plupart des gènes codant les enzymes de la voie des flavonoïdes, sauf l'*UFGT*, s'expriment dans les fleurs et durant la phase herbacée du développement de la baie, lorsque les flavonols et les proanthocyanidines sont synthétisés, puis leur expression diminue lors de la véraison. Après cette étape, tous les gènes structuraux, incluant l'*UFGT*, sont de nouveau exprimés, ce qui correspond au début de l'accumulation des anthocyanes (Boss *et al.*, 1996).

#### ***4.1.1. Les enzymes de la partie amont de la voie***

La biosynthèse des composés phénoliques commence à partir d'un acide aminé aromatique, la phénylalanine (Koukol et Conn, 1961), lui-même issu du métabolisme primaire, et plus particulièrement de la voie de l'acide shikimique. La désamination de la phénylalanine par la PAL (phénylalanine ammonia-lyase) (Koukol et Conn, 1961) est à l'origine de l'acide cinnamique, hydroxylé par la C4H (cinnamate 4-hydroxylase) (Russell et Conn, 1967) en acide p-coumarique, qui est transformé en 4-coumaroyl CoA par la 4CL (4-coumaroyl CoA ligase) (Heller et Forkmann, 1988).



**Figure 14.** Voies de biosynthèse des principales classes de flavonoïdes chez la vigne (Ikegami et al., 2007). ANS, anthocyanidine synthase ; ANR, anthocyanidine réductase ; CHS, chalcone synthase ; C4H, cinnamate-4-hydroxylase ; CHI, chalcone isomérase ; FLS, flavonol synthase ; F3H, flavanone 3-hydroxylase ; F3'H, flavonoïde 3' hydroxylase ; F3'5'H, flavonoïde 3'5'- hydroxylase ; DFR, dihydroflavonol réductase ; FLS, flavonol synthase ; GST, glutathione S-transferase ; LAR, leucoanthocyanidine 4- réductase ; LDOX, leucoanthocyanidine dioxygénase (aussi appelée ANS : anthocyanidine synthase) ; PAL, phenylalanine ammonia-lyase ; UFGT, UDP-glucose : Flavonoïde 3-O-glucosyltransférase ; 4CL, 4-coumarate : coenzyme A ligase.

La synthèse des flavonoïdes débute par l'action de la CHS appartenant à la famille des polykétides synthases qui catalyse la condensation d'une molécule de coumaroyl-CoA et de 3 molécules de malonyl-CoA en tétrahydroxychalcone (Ebel et Hahlbrock, 1982). Cette molécule est ensuite isomérisée en naringénine par la CHI (Moustafa et Wong, 1967). Chez la vigne, 3 gènes codant une CHS et 2 gènes codant une CHI ont été étudiés, et le profil d'accumulation des ARNm correspondants dans la baie est très différent. Dans la pellicule des baies de raisin en phase de maturation, les transcrits *CHS2* et *CHS3* sont 20 fois plus abondants que les transcrits *CHS1*. *CHS3* s'exprime uniquement dans la pellicule des cultivars colorés, tandis que *CHS1* et *CHS2* s'expriment dans la pellicule des cultivars rouges et blancs, ainsi que dans les feuilles (Goto-Yamamoto *et al.*, 2002). De même, on détecte 45 fois plus de transcrits *CHI1* que *CHI2* dans la pellicule des baies de raisin en phase de maturation (Jeong *et al.*, 2004).

La naringénine est le précurseur commun de tous les flavonoïdes, à l'exception des aurones. L'hétérocycle central de la naringénine est hydroxylé en position 3 par la F3H pour donner le dihydrokaempférol, précurseur du flavonol correspondant (Forkmann *et al.*, 1980). De plus, le cycle B de la naringénine peut être hydroxylé en position 3' par la F3'H pour donner la dihydroquercétine, ou en position 3' et 5' par la F3'5'H (Froemel *et al.*, 1985; Menting *et al.*, 1994), pour donner la dihydromyricétine. La F3H, de même que la FLS et la LDOX, appartient à la famille des dioxygénases dépendantes de l'oxoglutarate, tandis que la F3'H et la F3'5'H sont des mono-oxygénases de la famille des cytochromes P450.

Chez la vigne, trois *F3H*, quatre *F3'H* (*F3'H1* à *F3'H4*), et 10 isogènes codant des *F3'5'H* ont été identifiés (Jeong *et al.*, 2004 et 2006). Ces gènes sont différentiellement exprimés dans la baie. Généralement dans la baie de raisin, le rapport d'expression entre les *F3'H* et les *F3'5'H* reflète la composition en anthocyanes de la pellicule (Jeong *et al.*, 2006). La *F3'5'H* est fortement exprimée après véraison dans les cépages rouges mais pas dans les blancs, ce qui est cohérent avec les profils des flavonols (Mattivi *et al.*, 2006) et des anthocyanes, synthétisés à ce stade. En revanche, elle s'exprime dans tous les cépages avant véraison, en accord avec la présence d'unités épigallocatechine dans les proanthocyanidines des pellicules (Bogs *et al.*, 2006). Les dihydroflavonols (dihydrokaempférol, dihydromyricétine et dihydroquercétine) sont ensuite convertis en flavonols grâce à la FLS. Chez la vigne, au moins 5 FLS ayant des affinités préférentielles pour certains dihydroflavonols ont été identifiées (FLS1 à FLS5). L'expression des gènes codant la plupart de ces enzymes est régulée au cours du développement de la baie (Fujita *et al.*, 2006). Le profil d'expression des gènes *FLS*, notamment celui de *FLS4*, correspond à celui de l'accumulation des flavonols dans la baie (Downey *et al.*, 2003a).

#### 4.1.2. Les enzymes de la partie aval de la voie

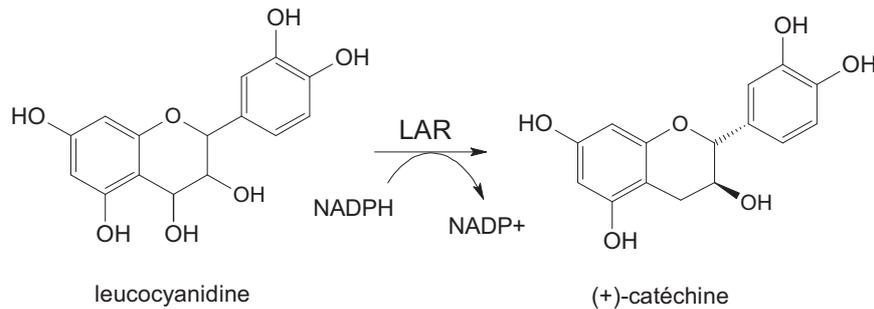
La DFR appartient à la famille des réductases dépendantes du NADPH, et est codée par un seul gène chez la vigne (Winkel-Shirley, 2001; Gollop *et al.*, 2002 ; Strafford et Lester, 1982). Elle permet la réduction des dihydroflavonols en flavan 3,4 diol, la dihydroquercétine et la dihydromyricétine donnant respectivement la leucocyanidine et la leucodelphinidine (Jeong *et al.*, 2006 ; Strafford et Lester, 1982). Comme la plupart des gènes codant les autres enzymes, la *DFR* s'exprime fortement dans la baie de raisin durant la phase herbacée, puis son expression diminue lors de la véraison, avant d'augmenter à nouveau régulièrement lors de la phase de maturation (Bogs *et al.*, 2005).

La leucocyanidine (ou leucodelphinidine) peut ensuite être réduite par la LAR pour donner la catéchine (ou la gallocatéchine) (Tanner *et al.*, 2003) (Figure 15), ou hydroxylée par la LDOX pour donner la cyanidine (ou la delphinidine) (Abrahams *et al.*, 2003). Par la suite, la cyanidine et la delphinidine sont réduites par l'ANR en épicatechine et en épigallocatechine respectivement (Figure 16) (Dixon *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2006). L'ANR et la LAR appartiennent à la famille des oxydoréductases. Chez la vigne, il semblerait qu'il n'existe qu'un seul gène codant une ANR, tandis que deux gènes *LAR* (*LAR1* et *LAR2*) présentant des profils d'expression spatiotemporelle différents ont déjà été identifiés (Bogs *et al.*, 2005). Les transcrits *VvLDOX*, s'expriment très tôt, avant l'anthèse, et leur expression continue d'augmenter après la pollinisation, parallèlement à la formation et la maturation des pépins. Dans la pellicule de la baie, *VvLDOX*, présente un profil d'expression en « U » s'exprimant en stade vert, son expression diminue fortement à la véraison pour reprendre à la maturation en parallèle à l'accumulation des anthocyanes dans les raisins rouges (Sparvoli *et al.*, 1994).

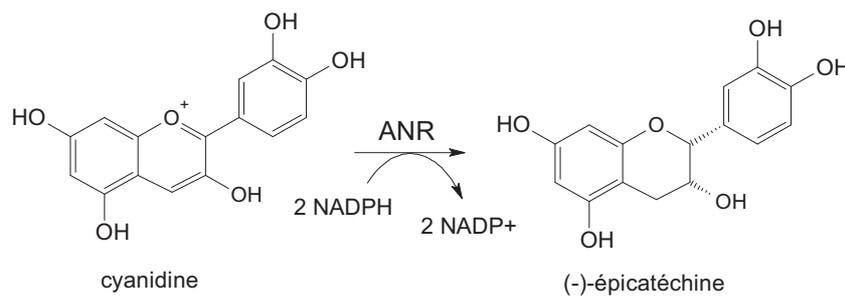
Quant aux *ANR* et *LAR*, ils sont exprimés de manière importante chez le raisin à partir de la floraison et jusqu'à véraison dans la pellicule et le pépin, lieu de stockage des proanthocyanidines (Bogs *et al.*, 2005). L'expression de *LAR1* est quasiment limitée aux pépins, tandis que celle de *LAR2* est observée dans la pellicule et le pépin (Bogs *et al.*, 2005), suggérant un rôle préférentiel de *LAR1* dans la synthèse des proanthocyanidines dans les pépins, et de *LAR2* dans la pellicule.

Enfin, les anthocyanidines (cyanidine et delphinidine), dérivant de la transformation des leucoanthocyanidines (flavan-3,4,-diols) incolores par la LDOX, peuvent être glucosylées par l'UFGT pour produire des anthocyanes stables (Macheix *et al.*, 2005). Le gène *VvAOMT* codant pour la protéine responsable de la méthylation des anthocyanes (sur les hydroxyles en 3' et en 5') a été récemment mis en évidence (Hugueney *et al.*, 2009). Cette protéine présente une activité sur les aglycones et sur les 3-monoglucosides. *VvUFGT* et *VvAOMT* présentent une expression « maturation-spécifique », en parallèle à l'accumulation des anthocyanes.

La plupart des gènes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes sont codés par des familles multigéniques chez la vigne. La signification de cette redondance n'est pas élucidée, du fait que seules certaines de ces familles multigéniques sont caractérisées à la fois fonctionnellement et au niveau de leur expression. Plusieurs corrélations entre l'expression des isogènes de *CHS*, *CHI* et *F3H* et les profils des flavonoïdes dans différentes parties de la plante et à différents stades révèlent que l'expression de certains des isogènes est spécifiquement associée à un type de molécules, par exemple celle de *CHI2* avec les flavan-3-ols (Jeong *et al.*, 2008).



**Figure 15.** Réaction catalysée par la leucoanthocyanidine réductase (LAR).



**Figure 16.** Réaction catalysée par l'anthocyanidine réductase (ANR).

Dans la littérature, deux familles d'acyltransférases ont été décrites comme pouvant être impliquées dans la modification des flavonoïdes et des acides hydroxycinnamiques : les acyltransférases de la famille des "serine carboxypeptidases-like" (SCPL) et les acyltransférases de la famille BAHD, nommée à partir des 4 premières acyltransférases identifiées (BEAT, AHCT, HCBT et DAT) (Tanaka *et al.*, 2008). Les premières catalysent des réactions d'acylation à partir d'un acyl-glucose sous forme ester (Lehfeldt *et al.*, 2000; Li and Steffens, 2000) tandis que les secondes utilisent comme donneur d'acyl un thioester acyl-CoA (Jend-Strid, 1991 ;Saint-Pierre et de Luca, 2000 ; D'Auria, 2006). Ces dernières présentent une faible spécificité vis-à-vis de l'accepteur de la fonction acyl. Des enzymes des deux familles ont été identifiées dans la voie métabolique des anthocyanes : par exemple, des acyltransférases de la famille SCPL, ont été identifiées chez *Daucus carota* (Glassgen *et al.*, 1992) et chez *Clitoria ternalea*, où elles sont localisées dans la vacuole (Noda *et al.*, 2006; Noda *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2008); des acyltransférases de la famille BAHD, localisées

au sein du cytoplasme, ont été caractérisées chez *Perilla frutescens* (Yonekura-Sakakibara et al., 2000), *Gentiana triflora* (Fujiwara et al., 1998) et *Arabidopsis thaliana* (Luo et al., 2007). De même, la synthèse d'esters d'acides hydroxycinnamiques peut être catalysée par des enzymes des deux familles : SPCL dans le cas des esters malique chez *Arabidopsis* (Lehfeldt et al., 2000) ; BADH, pour la biosynthèse des esters quiniques (acide chlorogénique) chez la tomate et les autres solanées (Niggeweg et al., 2004) et des esters malique chez le trèfle rouge (Sullivan, 2009). Les acyltransférases intervenant dans l'acylation des anthocyanes comme celles qui catalysent la galloylation des flavan-3-ols chez le raisin ne sont pas connues et pourraient appartenir à l'une ou l'autre des deux familles.

#### 4.2. Polymérisation des flavan-3-ols

La polymérisation des PAs reste parmi les mécanismes les moins connus de ces voies de biosynthèse. La réduction de la taxifoline (ou dihydroquercétine) et la formation des polymères de catéchine ont été réalisées par voie chimique (Delcour et al., 1983). L'expression ectopique de l'ANR de *Medicago* ou de vigne dans la fleur du tabac induit la production d'oligomères (Xie et al., 2003; Bogs et al., 2005). Jend-Strid (1991), a suggéré l'existence d'une enzyme de condensation spécifique pour la polymérisation suite à la comparaison de la composition de l'orge sauvage et son mutant *ant26*. Ceci-dit, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la mutation puisse affecter les conditions nécessaires pour la condensation de monomères et pour l'élongation des chaînes telles que le pH approprié, le transport approprié de l'unité terminale et / ou des unités d'élongation.

Tous les mécanismes proposés sont basés sur la réaction d'addition d'un nucléophile de flavan-3-ol (en C6 ou C8), sur un carbone en position C4 d'un électrophile activé, aboutissant à des oligomères et des polymères branchés et/ou linéaires selon la nature des liaisons interflavanes.

La voie la plus communément admise est celle où la flavan-3,4-diol (syn. leucoanthocyanidine) est le précurseur de l'unité supérieure. Chez la plupart des espèces du règne végétal, les unités d'extension observées sont les 2,3-cis (2R, 3R). La stéréochimie des leucoanthocyanidines dites «classique» (c'est-à-dire leucocyanidine, leucopelargonidine et leucodelphinidine) a été rarement étudiée, en raison de leur instabilité et de l'impossibilité de les isoler (Xie et Dixon, 2005; Davies et Scwin, 2006). Cependant, elles seraient de type 2,3-*trans*, comme leurs précurseurs, les dihydroflavonols.

Les DFR, LAR ou ANR appartenant à la famille des déshydrogénase réductase épimérase (RED), pourraient exercer une activité épimérase, en plus de leur activité réductase. Ainsi, Gargouri et al., (2010) ont démontré que l'ANR de raisin peut épimériser la (+)-catéchine en (-)-épicatechine, en cas d'excès de NADP<sup>+</sup>.

D'autres mécanismes ont été proposés pour cette réaction. Ils impliquent des intermédiaires réactionnels dans lesquels la stéréochimie est perdue. Plusieurs intermédiaires peuvent être envisagés. Les unités d'extension 2R, 3R pourraient dériver de la forme quinoïdale des anthocyanidines (Jacques et Haslam, 1974). L'ajout du flavan-3-ol sur le C4 d'anthocyane se produit dans le vin. Toutefois, cette réaction induit la production de proanthocyanidines de type A et non de type B (Bishop et Nagel 1984, Remy-Tanneau *et al.*, 2003).

Les flav-3-ène-3-ols ont également été proposés comme précurseurs des unités d'élongation (Jacques et Haslam, 1974, Xie et Dixon, 2005). Ils peuvent être des intermédiaires dans les réactions catalysées par l'ANR (Xie *et al.*, 2004) et LAR (Pfeiffer *et al.*, 2006). Les essais *in vitro* en présence de ces enzymes ne conduisent pas à la production d'oligomères (Xie *et al.*, 2004; Tanner *et al.*, 2003.). Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les conditions adéquates pour la polymérisation ne soient pas remplies.

La polymérisation oxydative des flavan-3-ols a également été proposée pour la formation des proanthocyanidines (Weinges *et al.*, 1969a). Toutefois, l'oxydation de l' (épi) catéchine génère des isomères des procyanidines dans lesquels les unités constitutives sont liées par des liaisons biphényle ou biphényl-éther entre le noyau B d'une unité et le noyau A de l'autre (Young *et al.*, 1987; Guyot *et al.*, 1996). La substitution du 3'hydroxyl comme dans l'épicatéchine-3'-glucoside récemment mise en évidence comme intermédiaire potentiel dans la biosynthèse des PAs (Pang *et al.*, 2008) pourrait prévenir la formation de telles molécules et orienter la condensation oxydative vers la formation de proanthocyanidines.

Le mutant d'*Arabidopsis thaliana* *tt10* ne montre aucune couleur brune dans ses graines, ce qui suggère que la protéine codée par le gène *TT10*, une laccase, oxyde les flavan-3-ols pour donner des pigments bruns (Pourcel *et al.*, 2005). Son implication dans la polymérisation oxydative a été proposée (Pang *et al.*, 2008). Cependant, ce mutant présente une grande quantité de PAs extractibles, et la localisation extracellulaire prédite par le peptide signal N-terminal que la protéine détient ne coïncide pas avec la participation de TT10 dans la polymérisation de PAs, localisées à l'intérieur de la vacuole (Pourcel *et al.*, 2005).

A ce jour, aucune information concernant le lieu de polymérisation à l'intérieur de la cellule n'est connue. Stafford *et al.*, (1982) ont suggéré que les unités inférieures et supérieures des monomères libres résultent de différentes étapes de la voie de biosynthèse plutôt que de la condensation d'unités semblables, et que les polymères sont construits avec des unités terminales préalablement stockées dans un endroit différent de celui où sont stockées les unités d'élongation.

Des études chimiques indiquent qu'un pH acide serait nécessaire pour la polymérisation (Delcour *et al.*, 1983), suggérant un compartiment intracellulaire pour cette réaction, tel que la vacuole ou des vésicules. Par ailleurs, l'ANR et la LAR ont été localisées dans le cytoplasme (Pang *et al.*, 2007) d'où l'interrogation concernant le transport des unités terminales et des unités d'élongation ou de leurs précurseurs vers la vacuole.

### **4.3. Transport et stockage des flavonoïdes**

L'accumulation des flavonoïdes est la conséquence de deux processus : d'une part, la synthèse d'un composé stable et, d'autre part, la mise en place d'un mécanisme de stockage. En effet, les flavonoïdes sont transportés et accumulés dans la vacuole pour atteindre des concentrations suffisantes afin d'assurer des avantages écologiques et physiologiques, tout en évitant des effets toxiques pour la cellule. Le mécanisme de transport des flavonoïdes peut être comparé aux mécanismes de transport de xénobiotiques ayant comme objectif de détoxifier la cellule.

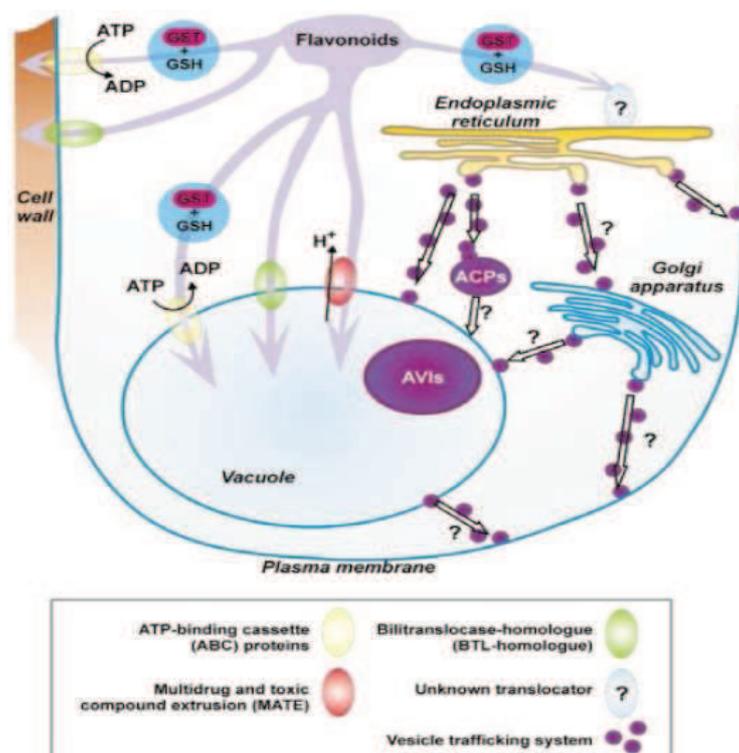
Le processus de détoxification comporte trois étapes: les deux premières étapes sont des modifications structurales sur la molécule permettant son inactivation, la dernière étape permet sa compartimentation (Coleman *et al.*, 1997). L'étape I permet la formation de sites actifs avec l'exposition de groupements fonctionnels permettant la création de liaisons covalentes avec des molécules hydrophiles au cours de l'étape II. Elle est caractérisée par une série de réactions d'hydrolyse et d'oxydation, situées sur les membranes du réticulum endoplasmique (RE). La plupart de ces réactions sont catalysées par des systèmes enzymatiques type cytochromes P-450 (Bolwell *et al.*, 1994). L'étape II permet la formation de molécules plus stables et solubles pour diminuer leur interaction avec les membranes cellulaires et ainsi éviter leur dispersion dans la cellule. Cette étape permet le marquage nécessaire des molécules pour leur reconnaissance par les différents mécanismes de transport. Elle est caractérisée par une série de réactions catalysées par des transférases (glycosyl-, acyl-, méthyl- et glutathion-S-transférases). La dernière étape III correspond au transport de ces molécules dans la vacuole ou l'apoplaste. Elle fait intervenir des acteurs tels que des transporteurs tonoplastiques (Sandermann, 1992).

En 1974, Stafford émet l'hypothèse que la majorité des enzymes de la voie générale des phénylpropanoïdes, fonctionnent comme un complexe multienzymatique. En 1992, Hrazdina et Jensen proposent un modèle où ce complexe serait assemblé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) à travers de faibles interactions entre les protéines. Plus tard, ce modèle a été démontré par l'observation d'interactions directes entre la CHI et la DFR, entre la PAL et la C4H, et entre la CHI et la F3H (Burbulis et Winkel-Shirley, 1999; Achnine *et al.*, 2004).

Chez arabidopsis, la CHI, la CHS, la DFR et la F3H ont été identifiées et colocalisent au niveau du RE (Saslowsky et Winkel-Shirley, 2001; Lepiniec *et al.*, 2006).

De la même façon, chez le riz, OsCHS1 semble interagir avec OsF3H, OsF3'H, OsDFR et OsANS1, au sein d'un complexe macromoléculaire (Shih *et al.*, 2008). Cependant, d'autres protéines, comme la LAR et ANR, ont été localisées dans le cytoplasme chez *Medicago truncatula* via l'observation de protéines de fusion GFP et ne semblent pas appartenir à ce complexe multienzymatique (Pang *et al.*, 2007).

La plupart des flavonoïdes sont conjugués (anthocyanes, flavonols et flavones glycosides) et sont principalement localisés dans les vacuoles (Winkel-Shirley, 2001; Dixon *et al.*, 2005; Lepiniec *et al.*, 2006; Abrahams *et al.*, 2002; Cadot *et al.*, 2006). La localisation des flavonoïdes dans les cellules végétales, associée à une biosynthèse au niveau de la face cytosolique du RE, implique un système de transport complexe des molécules vers leurs sites de stockage et soulève la question concernant leur acheminement à travers le cytoplasme et par conséquent leur transport à travers le tonoplast. Au moins deux modèles permettant le transport des molécules à partir du RE vers la vacuole (Grotewold, 2008) ont été décrits dans la littérature (Figure 17): le premier implique l'intervention de protéines de transport comme les glutathion S-transférases (GST) (Mueller et Walbot., 2001), le second la formation de vésicules dérivées du RE (Kitamura, 2006, Chafe et Durzan, 1973; Baur et Walkinshaw, 1974; Parham et Kaustinen, 1977, Suzuki *et al.*, 2003, Hsieh et Huang, 2007).



**Figure 17.** Schéma hypothétique du modèle de transport des flavonoïdes par des transporteurs membranaires et vésiculaires, d'après Braidot *et al.* (2008).

Les flavonoïdes pourraient être conjugués avec le glutathion (GSH) par une réaction catalysée par la GST. Les principaux transporteurs localisés sur la vacuole et la membrane plasmique sont les ATP-binding cassettes (ABC) et les protéines bilitranslocase-homologue (BTL-homologue) et les protéines MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion). Les structures vésiculaires sont de couleur mauve (AVI, anthocyaniques inclusions vacuolaires; ACP, anthocyanoplastes). Les points d'interrogation indiquent l'absence d'information sur certaines étapes dans le processus.

#### **4.3.1. L'implication de « protéines de transport »**

##### *4.3.1.1. Les glutathion S-transférases*

Plusieurs études ont montré l'implication des GST dans l'accumulation des Flavonoïdes chez *Arabidopsis* (*tt19*), *Pétunia* (*an9*) ou le maïs (*bz2*) (Marrs *et al.*, 1995; Alfenito *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 2004; Peel *et al.*, 2009). Toutefois, l'activité enzymatique de la GST ne semble pas être requise pour le ciblage approprié du composé vers la vacuole, car aucun flavonoïde glutathionylé n'a pu être détecté dans les expériences *in vivo* ou *in vitro* (Mueller *et al.*, 2000). La GST serait donc capable de fonctionner en tant que ligand en se liant aux anthocyanes et aux PAs (ou à leurs unités monomères) pour former des complexes GST-flavonoïde, les protégeant de l'oxydation et les transportant du RE à travers le cytoplasme vers le tonoplaste vacuolaire (Kitamura *et al.*, 2010). Sa localisation intracellulaire dans le cytosol est conforme à cette fonction (Kitamura *et al.*, 2010).

Chez le raisin, la GST a été systématiquement associée à l'accumulation des anthocyanes (Terrier *et al.*, 2005; Ageorges *et al.*, 2006). Cette GST complète les mutants *bz2* (Conn *et al.*, 2008). En revanche, il est très peu probable que cette GST soit impliquée dans le transport des PAs, puisque son expression est limitée aux stades de maturation de la baie lorsque la synthèse des PAs a cessé.

##### *4.3.1.2. Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) et ATPases*

Dans la vacuole, les flavonoïdes se trouvent à des concentrations environ 5 fois plus importantes que dans le cytoplasme (Martinoia *et al.*, 2007). Leur transport vers la vacuole contre un gradient de concentration requiert donc un apport d'énergie. L'apport d'énergie nécessaire aux transports à travers le tonoplaste peut être assuré soit à partir d'un transport actif primaire, soit à partir d'un transport secondaire. Dans le cas des transports actifs primaires, le transport est couplé directement à l'hydrolyse de liaisons riches en énergie de molécules telles que l'ATP grâce à des transporteurs appartenant à la famille des ATP-Binding Cassette proteins (ABC) (Lu *et al.*, 1997; Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001; Frangne *et*

*al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2004;). De tels transporteurs sont impliqués dans le trafic d'hormones, de lipides, de métaux, de métabolites secondaires et de xénobiotiques (Verries *et al.*, 2008). Récemment, chez le maïs (*Zea mays*), un transporteur nommé MRP3 (Multidrug Resistance-associated Protein), localisé sur la membrane tonoplastique, appartenant à la sous-famille des ABC-C et impliqué dans le transport des anthocyanes, a été identifié (Goodman *et al.*, 2004). Le mutant *mrp3* accumule les anthocyanes uniquement au sein du cytoplasme sans aucune altération de leur composition (Goodman *et al.*, 2004; Kitamura, 2006).

Dans le cas des transporteurs secondaires, l'énergie nécessaire est fournie par des pompes primaires capables d'utiliser l'énergie des molécules riches en énergie et de la transformer en gradient électrochimique de part et d'autre d'une membrane. On distingue trois grands types de pompes à proton primaires sur les membranes plasmiques et vacuolaires. Au niveau de la membrane plasmique, le gradient électrochimique est assuré par des pompes à protons appartenant à la famille des P-ATPases (Sze *et al.*, 1999). Au niveau de la membrane vacuolaire, le gradient électrochimique est assuré par des pompes à protons appartenant à la famille des V-ATPases et des V-PPases (Hedrich *et al.*, 1989). Ces dernières assurent un flux de protons vers l'intérieur de la vacuole permettant de générer une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane et d'acidifier la vacuole (Sze *et al.*, 1999). La pompe V-ATPase utilise l'ATP comme source d'énergie et, en plus de sa localisation tonoplastique, elle a été trouvée sur des membranes cellulaires telles que les membranes du RE, de vésicules et de l'appareil de Golgi (Martinoia *et al.*, 2007). La pompe V-PPase utilise le pyrophosphate (PPi) comme source d'énergie (Maeshima, 2000). Chez la baie de raisin, l'activité de la V-PPase est plus importante que celle de la V-ATPase, et joue un rôle prédominant dans l'apport d'énergie au niveau du tonoplaste tout au long du développement de la baie (Terrier *et al.*, 1998; Terrier *et al.*, 2001). Récemment, deux pompes de type P-ATPases, AHA10 et PH5 ont été localisées sur le tonoplaste respectivement chez *Arabidopsis* et le pétunia et seraient également impliquées dans l'acidification de la vacuole (Baxter *et al.*, 2005; Verweij *et al.*, 2008). Chez *Arabidopsis*, le mutant *aha10* montre une forte diminution de l'accumulation des proanthocyanidines (Baxter *et al.*, 2005). Les auteurs ont observé une malformation de la vacuole, et ont alors suggéré une implication d'AHA10 dans l'acidification de pro-vacuoles nécessaire à la maturation de la vacuole. Chez pétunia, le mutant *ph5* présente une réduction de l'acidification vacuolaire dans les fleurs et une diminution de l'accumulation de proanthocyanidines dans la graine (Baxter *et al.*, 2005; Verweij *et al.*, 2008). A la différence du mutant *aha10*, les auteurs n'ont pas observé de malformation de la vacuole.

#### 4.3.1.3. Les transporteurs de type MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion)

Les premiers travaux sur le transport de flavonoïdes avaient déjà suggéré l'implication de transporteurs secondaires après décoration de ces composés (Matern *et al.*, 1986; Hopp et Seitz, 1987; Klein *et al.*, 1996; Marinova *et al.*, 2007). Chez la carotte et le persil, une décoration acyl- des molécules est indispensable pour le transport des flavonoïdes (Matern *et al.*, 1986; Hopp et Seitz, 1987). Chez *arabidopsis*, une décoration glucosyl- de ces composés s'est avérée nécessaire (Klein *et al.*, 1996; Marinova *et al.*, 2007).

Le premier transporteur secondaire de flavonoïdes mis en évidence chez les plantes est TT12, un transporteur de type MATE identifié chez *arabidopsis* (Debeaujon *et al.*, 2001). L'étude de la séquence de TT12 a montré que cette protéine appartient à une famille de transporteurs, celle des Multidrug and Toxic Extrusion (MATE) (Brown *et al.*, 1999). Chez les bactéries, cette famille est décrite comme étant associée à la résistance aux produits pharmaceutiques (Omote *et al.*, 2006). Les protéines de type MATE sont fortement conservées et présentes dans tout le règne du vivant (Moriyama *et al.*, 2008). Chez les végétaux, des MATEs ont été identifiés comme étant impliqués dans l'excrétion du citrate et du malate hors de l'apex racinaire (Durrett *et al.*, 2007; Furukawa *et al.*, 2007; Magalhaes *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Plus récemment, chez le tabac, des MATEs ont été identifiés intervenant dans le transport de nicotine dans la vacuole (Morita *et al.*, 2009; Shoji *et al.*, 2009). Le mutant *tt12* a montré une forte diminution de l'accumulation des proanthocyanidines dans la graine. Des analyses ultérieures du mutant *tt12* ont montré une absence de (-)-épicatéchine, de ses polymères dérivés ainsi qu'une diminution de l'ordre de 30 à 50% du flavonol quercétine 3-O-rhamnoside (Q3R) (Marinova *et al.*, 2007). Néanmoins, des expériences de transport *in vitro* dans des vésicules de levures transformées avec *TT12* n'ont donné aucun résultat avec la (-)-épicatéchine et la quercétine 3-rhamnoside. TT12 a cependant permis le transport *in vitro* d'une anthocyane glucosylée, la cyanidine 3-O-glucoside (Marinova *et al.*, 2007). Ce transport étant inhibé par la (+)-catéchine 3-O-glucoside, les auteurs ont donc suggéré l'implication *in planta* de TT12 dans le transport d'épicatéchine glucosylée. Récemment, la détection d'une quantité importante de glucoside d'épicatéchine dans les graines immatures du mutant *tt12* suggère que la forme glucosylée d'épicatéchine pourrait être un métabolite intermédiaire qui sert en tant que substrat du transporteur MATE (Kitamura *et al.*, 2010). Des expériences de transport *in vitro* dans des vésicules de levures transformées avec *TT12* ont montré que la (-)-épicatéchine- 3'-O-glucoside était un substrat potentiel (Zhao et Dixon, 2009).

Dans les racines transgéniques de *Medicago truncatula*, une GT (glucosyltransférases) est induite en parallèle avec l'accumulation de PA (Pang *et al.*, 2008). Après expression hétérologue chez *E. coli*, la protéine a été démontrée capable de catalyser la formation

d'épicatechine 3'-glucoside en utilisant la (-)-épicatechine comme substrat *in vitro*. L'épicatechine 3'-glucoside a été détectée comme un composant temporaire au sein des graines de *Medicago* lors de l'accumulation PA, ce qui suggère que cette molécule serait ensuite déglucosylée.

Un orthologue de TT12, appelé MATE1, et impliqué dans le transport de la (-)-épicatechine-3'-O-glucoside a été identifié chez *Medicago truncatula* et validé fonctionnellement (Zhao et Dixon, 2009; Pang *et al.*, 2008).

Chez le raisin, le transcrit *CAO69962* identifié par criblage transcriptomique à partir des racines transgénique suraccumulant des PAs, serait un orthologue de *MATE1* et *TT12* (Terrier *et al.*, 2009). Sa validation fonctionnelle n'a pas été effectuée.

Des MATEs potentiellement impliqués dans le transport d'anthocyanes ont aussi été identifiés chez la tomate *MTP77* (Mathews *et al.*, 2003), chez *Antirrhinum majus* (Schwinn *et al.*, 2006) et chez *Medicago truncatula* (Peel *et al.*, 2009). Récemment deux gènes appelés *anthoMATE*, isolés à partir de baies de raisins, ont été démontrés comme intervenant dans le transport des anthocyanes acylées (Gomez *et al.*, 2009).

#### 4.3.1.4. Transporteur de types BTT

La dernière catégorie de transporteurs impliqués potentiellement dans l'acheminement des flavonoïdes dans la baie de raisin concerne une protéine membranaire homologue à une protéine de mammifère, la bilitranslocase (BTL) (Braidot *et al.*, 2008; Bertolini *et al.*, 2009). Ces auteurs ont identifié dans le raisin blanc et le raisin rouge une protéine homologue à un transporteur d'anions localisé dans le foie des mammifères, la bilitranslocase (BTL) (Passamonti *et al.*, 2005). La bilitranslocase a été initialement caractérisée dans le transport de bilirubine du sang vers le foie. Les similitudes chimiques, moléculaires et cinétiques entre les BTL des mammifères et des plantes suggèrent un rôle dans la translocation et l'accumulation des flavonoïdes dans les baies de raisin (Braidot *et al.*, 2008). Des travaux d'inhibition de transport *in vitro* ont montré l'existence d'interactions entre des anthocyanes glucosylées et ce transporteur (Passamonti *et al.*, 2002). Un anticorps anti-bilitranslocase de foie a permis d'identifier une protéine homologue chez le raisin. Des expériences d'immunolocalisation, réalisées sur du raisin mûr, ont montré la présence d'un signal dans la pellicule de raisin rouge et blanc (Braidot *et al.*, 2008; Bertolini *et al.*, 2009). Cependant, les images observées en lumière visible ne permettent pas de distinguer les différentes assises cellulaires, les compartiments cellulaires, ni même la présence d'anthocyanes dans le cas des raisins rouges. Un Western-Blot a été également réalisé et montre la présence d'une protéine de 31 KD dans la pellicule et la pulpe de raisins mûrs. Des expériences de transport ont été réalisées à partir

d'extraction de vésicules de pulpe de raisin. Le substrat bromosulfaléine a été utilisé et un transport a été observé. Ce travail ne permet pas de conclure sur l'implication de la bilitranslocase dans le transport de flavonoïdes. Par ailleurs, le gène codant pour la protéine reconnue par l'anticorps n'est pas caractérisé à ce jour. Cette identification permettrait d'établir des preuves plus directes et spécifiques quant à l'implication de cette protéine dans le transport des flavonoïdes.

#### **4.3.2. Le modèle vésiculaire**

Ce mécanisme permettrait le transport des flavonoïdes du RE jusqu'à la vacuole dans des vésicules dérivées du RE (Chafe et Durzan, 1973; Baur et Walkinshaw, 1974; Parham et Kaustinen, 1977).

Cette hypothèse repose notamment sur les observations en microscopie du trafic des anthocyanes (Markham *et al.*, 2000; Grotewold, 2004; Braidot *et al.*, 2008). Zhang *et al.*, (2006) ont observé des vésicules pré-vacuolaires de tailles allant de 0,2 à quelques microns dans le cytoplasme des cellules des pétales de lisianthus. De petites vésicules accumulant des anthocyanes ont été de même observées dans le cytoplasme des cellules de maïs. Les études réalisées sur des cultures de cellules de vigne ont permis de localiser les anthocyanes dans des vésicules cytoplasmiques appelées anthocyanoplastes (Calderon *et al.*, 1993). Or, d'après Conn *et al.*, (2003), dans les vacuoles, ces structures sont absentes, les anthocyanes étant alors localisées dans des inclusions vacuolaires (AVIs), dépourvues de membrane et associées à des protéines ou des substances membranaires (Markham *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006). Selon les observations de Zhang *et al.*, (2006), les anthocyanoplastes, après leur synthèse au niveau du RE, s'associeraient à des structures prévacuolaires (PVCs) pour être transportés dans la vacuole puis fusionneraient avec les AVIs. Les vésicules contenant les anthocyanes pourraient également fusionner avec des vacuoles de stockage de protéines (PSVs) ou être transportées via le système transgolgien sans emprunter la voie vésiculaire RE-vacuole (Poutska *et al.*, 2007). Le transport vésiculaire nécessite des protéines ou des séquences d'adressage de type GTPases, SNARE, récepteurs vacuolaires pour permettre l'adressage, la fusion et le recyclage des vésicules (Molendijk *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2006; Lipka *et al.*, 2007).

De petites vésicules (0.5-3  $\mu\text{m}$ ) contenant des tanins ont été détectés dans le cytoplasme des feuilles de thé (Suzuki *et al.*, 2003). Abrahams *et al.* (2002) ont démontré que les PAs pourraient être transportées et fusionnées avec la vacuole par un système de vésicules prévacuolaires similaires. Ce type de vésicules a également été observé pour d'autres flavonoïdes. Hsieh et Huang (2005, 2007) ont identifié des petites structures de l'ordre de 2 microns dérivées du RE appelés tapetosomes permettant le transport des flavonols chez *Brassica*.

Des études récentes réalisées sur des tissus hairy roots de vigne produisant des anthocyanes ont montré leur localisation non seulement dans la vacuole mais aussi dans des vésicules de tailles diverses (Gomez *et al.*, 2011). De petites vésicules très mobiles ont notamment été observées le long du tonoplaste, suggérant un transport vésiculaire en direction de la vacuole. Les transporteurs AnthoMATE sont associés à ces petites vésicules. Des constructions antisens ont été réalisées pour ces deux gènes (Gomez *et al.*, 2011). Des hairy-roots *AM3*-antisense sont dépourvus de ces petites vésicules remplies d'anthocyanes, suggérant que les protéines de type MATE ont un rôle dans le remplissage des vésicules.

#### **4.4. Régulation de la voie de biosynthèse.**

L'analyse des différents mutants a permis l'identification de plusieurs protéines régulatrices de la biosynthèse des PAs. À ce jour, les protéines identifiées chez *arabidopsis* et impliquées dans la régulation des PAs peuvent être classées en six grandes familles: MYB, bHLH, WD40, WRKY, WIP-type Zinc finger, et MADS (Lepiniec *et al.*, 2006.). Par exemple, les gènes *TT1* et *TT16* codent respectivement pour des facteurs de transcription de type WIP-Zinc finger et MADS (Sagasser *et al.*, 2002, Nesi *et al.*, 2002). Ces deux gènes sont impliqués dans l'accumulation des PAs durant le cycle de développement des graines, principalement dans la différenciation cellulaire nécessaire à la synthèse de ces PAs. *TTG2* est un facteur de transcription de type WRKY impliqué dans la différenciation des cellules épidermiques, et dans l'accumulation des tanins condensés et du mucilage dans les graines. Il est supposé intervenir dans la régulation de l'accumulation des PAs en aval de *TTG1* (Johnson *et al.*, 2002).

Le gène *TT2* code pour un facteur MYB, le gène *TTG1* pour une protéine type WD40 et le gène *TT8* pour un facteur bHLH (Nesi *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 1999). Les mutants associés à ces gènes produisent des pépins sans PAs.

Baudry *et al.* (2004) ont mis en évidence l'existence d'un complexe ternaire stable *TTG1-TT8-TT2* avec une interaction directe de *TT8* et *TT2* sur l'ADN en activant l'expression de *BAN*. En effet, la combinaison *TT2+TT8* est suffisante pour se lier au promoteur *BAN* et l'activer. *TTG1* ne semble pas participer à la reconnaissance spécifique du promoteur de *BAN* mais son rôle ultime est de renforcer la capacité d'activation de la combinaison *TT2+TT8*, conformément à la fonction commune de protéines WD40 connues pour leur facilité d'interaction protéique (Baudry *et al.*, 2004, Ramsay et Glover, 2005).

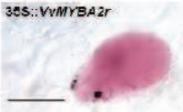
Chez *arabidopsis*, *AtMYB4* codant une protéine de domaine R2R3-MYB est un régulateur négatif de la synthèse des acides hydroxycinnamiques, principalement en contrôlant l'expression d'*AtC4H* (cinnamate-4-hydroxylase) (Jin *et al.*, 2000). De même, la

surexpression d'*AtMYBL2* réprime la synthèse des anthocyanes dans les plantules d'*arabidopsis*, ainsi que la synthèse des tanins condensés dans le tégument des graines. Cette répression est probablement due à la concurrence qui existe entre ce gène et d'autres *TT2* ou *MYBs* spécifiques dans l'activation (Dubos *et al.*, 2008). Récemment, un nouveau mutant *tt sk-21d* a été identifié (Gao *et al.*, 2010). Le gène impliqué dans ce phénotype est *KAN4*, codant pour une protéine de type GARP MYB, initialement identifiée comme impliquée dans la différenciation cellulaire (McAbee *et al.*, 2006), et dont la surexpression conduit à une diminution des PAs dans les pépins.

Grâce aux outils génomiques élaborés récemment et en se basant sur les connaissances acquises chez les plantes modèles concernant des régulateurs de la synthèse de PAs, de nouveaux régulateurs potentiellement impliqués dans la synthèse des PAs ont été mis en évidence chez d'autres espèces: Ainsi une protéine WD40 a été identifiée chez *Medicago truncatula* (Pang *et al.*, 2009) et des facteurs MYB ont été identifiés chez *Brassica napus*, *Lotus japonicus*, le peuplier et *Diospyros kaki* (Wei *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2008; Akagi *et al.*, 2009; Mellway *et al.*, 2009).

Au cours des cinq dernières années, plusieurs protéines impliquées dans la régulation de la voie des phénylpropanoïdes / Flavonoïdes ont été identifiées dans les baies de raisin (Deluc *et al.*, 2006; Bogs *et al.*, 2007; Deluc *et al.*, 2008; Matus *et al.*, 2008; Terrier *et al.*, 2009; Hichri *et al.*, 2010; Matus *et al.*, 2010) (Tableau 1)

**Tableau 1.** Exemples de facteurs de transcription de type MYB intervenant dans la synthèse des flavonoïdes chez *Vitis vinifera*.

Gène	Phénotype	Références
<i>VvMYBA1</i> ; <i>VvMYBA2</i> ; <i>VvMYBA3</i>	Gouvernent la couleur des baies (accumulation d'anthocyanes dans la pellicule). 	Kobayashi <i>et al.</i> , 2002 et 2004; Walker <i>et al.</i> , 2007; Cutanda-Perez <i>et al.</i> , 2008
<i>VvMYBPA1</i> ; <i>VvMYBPA2</i>	Régulent la synthèse des tanins condensés au cours du développement de la baie. 	Bogs <i>et al.</i> , 2007; Terrier <i>et al.</i> , 2009
<i>VvMYB5a</i> ; <i>VvMYB5b</i>	Régulent la voie générale des flavonoïdes. 	Deluc <i>et al.</i> , 2006 et 2008

À ce jour, sept facteurs de transcription type MYB ont été identifiés. Chez le Cabernet Sauvignon, le locus gouvernant la couleur des baies comprend au moins trois gènes, *VvMYBA1*, *VvMYBA2* et *VvMYBA3*.

Les facteurs *MYB5a* et *MYB5b* ont été décrits comme étant associés à la régulation de la voie des flavonoïdes (Deluc *et al.*, 2006). *VvMYB5a* s'exprime préférentiellement dans la pellicule avant la véraison, de façon concomitante à l'accumulation des proanthocyanidines dans la baie (Deluc *et al.*, 2006 et 2008). *VvMYB5b* s'exprime fortement dans les pépins avant véraison et dans la pellicule aux premiers stades de développement de la baie puis lors de la maturation (Deluc *et al.*, 2006 et 2008).

La surexpression de *MYB5a* et *MYB5b* dans le tabac provoque l'accumulation de proanthocyanidines, d'anthocyanes, de flavonols et de lignines et induit l'expression de *C4H*, *CHI*, *LDOX*, *ANR* et *LAR* (Deluc *et al.*, 2006 et 2008).

Récemment, deux gènes régulant plus spécifiquement la biosynthèse des tanins condensés ont été identifiés chez *V. vinifera*, *VvMYBPA1* et *VvMYBPA2* (Bogs *et al.*, 2007; Terrier *et al.*, 2009). Leur expression spatio-temporelle coïncide avec celle de l'accumulation des tanins condensés dans la baie: *VvMYBPA1* et *VvMYBPA2* s'expriment tous deux fortement avant véraison, respectivement dans les pépins et la pellicule. *VvMYBPA1* est capable de compléter le mutant *tt2* d'arabidopsis, (Bogs *et al.*, 2007). L'expression ectopique de *MYBPA1* et *MYBPA2* dans des hairy roots de vigne induit l'accumulation de PA (Terrier *et al.*, 2009). Dans des cellules de vignes, Bogs *et al.*, (2007) ont montré que *MYBPA1* active les promoteurs de *CHI*, *F3'5'H*, *LDOX*, *ANR* et *LARI*. Une analyse transcriptomique haut-débit a permis de mettre en évidence que *VvMYBPA1* et *VvMYBPA2* induisent la surexpression de plusieurs gènes dont la plupart étaient connus pour avoir une fonction dans la synthèse des flavonoïdes (Terrier *et al.*, 2009).

Récemment, deux protéines de type WD40, *WDR1* et *WDR2*, et deux autres de type bHLH, *MYC1* et *MYCA1*, impliquées dans la synthèse des flavonoïdes ont été identifiées (Matus *et al.*, 2010; Hichri *et al.*, 2010). Les profils d'expression de *WDR1* et *WDR2* sont similaires: ils sont exprimés à la fois dans la pellicule et dans les pépins tout au long du cycle de développement de la baie de raisin avec une expression maximale pendant la maturation.

Les profils d'expression des deux facteurs de transcription *VvWDR1* et *VvMYCA1* sont respectivement en corrélation avec les profils d'expression de l'*ANR* et de l'*UFGT*, ce qui suggère leur rôle putatif en tant que régulateurs de synthèse des PAs et des anthocyanes (Bogs

et *al.*, 2005; Matus *et al.*, 2010). Cependant, la surexpression de *VvWDR1* chez arabidopsis n'a pas modifié l'accumulation des PAs. Une interaction de *MYC1* avec les facteurs de transcription *MYBAs* connus pour induire spécifiquement la biosynthèse des anthocyanes a été démontrée (Hichri *et al.*, 2010). Il semble donc que, dans le raisin comme chez Arabidopsis, la régulation est assurée par un complexe supramoléculaire comprenant les facteurs MYB et MYC.

## 5. PROBLEMATIQUE

A la lumière de l'analyse bibliographique réalisée, il apparaît donc que des étapes clés dans la voie de biosynthèse de ces composés restent à élucider.

Par exemple, peu de choses sont connues sur les mécanismes impliqués dans la polymérisation ou la galloylation d'unités de PAs, ou leur transport dans la vacuole qui est leur site de stockage définitif (Martin *et al.*, 1999 ; Martinoia *et al.*, 2001).

Suite à la surexpression des deux facteurs de transcription *MybPA1* et *MybPA2*, une étude transcriptomique a permis l'identification de plusieurs gènes candidats, potentiellement impliqués dans la synthèse de ces composés et dont l'expression est induite (Terrier *et al.*, 2009). Parmi ces gènes candidats, on retrouve des gènes déjà connus pour participer à ces voies de biosynthèse et d'autres dont la fonction dans ce métabolisme reste à démontrer, dont des *VvgGT* codant pour des GlucosylTransférases (*VvgGT1*, *VvgGT2*, *VvgGT3*) et des *VvGAT* codant pour des Glucose- AcylTransférases (*VvGAT1*, *VvGAT2*).

L'induction de ces gènes liés au métabolisme du sucre était surprenante, puisque les tanins de raisin ne sont pas glucosylés.

La caractérisation du rôle de ces enzymes dans les étapes de synthèse et/ou de stockage de certains métabolites phénoliques était nécessaire. Les deux parties de cette thèse seront donc 1) l'étude des glucosyltransférases et 2) celle des glucose- acyltransférases, via l'étude de leurs séquences, de leurs profils d'expression, la caractérisation des protéines *in vitro* (après production de protéines hétérologues) et leur localisation intracellulaire.

## **CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES**

## 1. MATERIEL BIOLOGIQUE

### 1.1. Matériel végétal

Les baies de raisin (*V. vinifera* L. cv. *Syrah*) ont été prélevées à différents stades de développement sur les vignes du site de l'INRA-SupAgro (Montpellier, France). Les trois premiers stades correspondent à des baies vertes, récoltées respectivement à 11, 18 et 35 jours après anthèse. A la véraison (jour 52) les baies ont été séparées en deux lots : un premier lot correspondant à des baies vertes et dures et un second contenant des baies molles vérees mais encore vertes. Après véraison, les baies ont été prélevées à trois stades de développement, respectivement à 65, 86 et 99 jours après anthèse. Aux stades 18 jours, véraison (jour 52) et 99 jours, les pellicules, pulpes et pépins ont été séparés. A chaque prélèvement, les baies ont été lavées, pesées et comptées puis immédiatement congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Avant extraction des ARNs, chaque échantillon a été épépiné puis réduit en poudre à l'aide d'un broyeur à billes de type Dangoumeau (Dangoumill 300, Lonjumeau, France), sous azote liquide.

Des vitroplants de *V. vinifera* L. cv. *Maccabeu* ont été utilisés pour les expériences de transformation génétique. Les plants sont cultivés dans du MS/2 (milieu Murashige et Skoog, dilution au demi) solide jusqu'à ce qu'ils développent 5 nœuds nécessaires pour la transformation génétique.

### 1.2. Souches bactériennes et de levures

**Tableau 2** : Liste des souches bactériennes et souches de levures utilisées dans ce travail

Souche	Description	Origine
<i>Escherichia coli</i> DH5α®	Souche commerciale	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Souche commerciale	Stratagene
<i>Pichia pastoris</i> x33	Souche commerciale	Carlsbad, CA, USA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W2579	Souche modifiée	Laboratoire Carlsberg, Danemark
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1	Souche commerciale	Invitrogen
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> A4	Conservatoire national	INRA Angers

#### 1.2.1. *Escherichia coli* DH5α®

La souche *E. coli* DH5α® (Invitrogen) est utilisée pour l'ensemble des manipulations de biologie moléculaire. Cette bactérie a le génotype suivant : F-f80lacZDM15 *recA1 endA1 gyrA95 thi-1, hsdR17 (rk -, mk+) supE44 relA1 deoR D (lacZYA-argF) U169*. Sa croissance est inhibée par l'expression du gène *ccdB* contenu dans tous les vecteurs d'entrée et de

destination de la technologie GATEWAY. Elle est déficiente en endonucléases (endA), ce qui améliore la qualité des préparations d'ADN. D'autre part, la mutation sur le gène *recA*, la rendant déficiente pour la recombinaison homologe, évite les risques de mutations du plasmide au cours de sa préparation.

### **1.2.2. *Escherichia coli* BL21(DE3)**

La souche *E. coli* BL21(DE3) est commercialisée par Stratagene. Cette souche a la particularité, comme toutes les souches *E. coli* B, d'être dépourvue de la protéase majoritaire, codée par le gène *lon*, qui catalyse le clivage endoprotéolytique des protéines recombinantes de la cellule. Ce système est donc particulièrement adapté pour la production de protéines hétérologues intègres.

### **1.2.3. *Pichia pastoris* x33**

*P. pastoris* X- 33 est une levure méthylo-trophe. Elle est utilisée pour l'expression des protéines hétérologues et est issue de la souche sauvage NRRL- Y11430 (Northern regional Laboratories, Peroria, IL, USA). *P. pastoris* X- 33 possède 2 gènes *AOX*, nommés *AOX1* et *AOX2*, inductibles par le méthanol. Cette souche est de phénotype Mut+ (Méthanol Utilisation plus, ayant la capacité à utiliser le méthanol comme source de carbone). Cette souche commerciale provient de Carlsbad, CA, USA.

### **1.2.4. *Saccharomyces cerevisiae* W2579**

La souche de *S. cerevisiae* W2579 a été obtenue du centre de recherche de Carlsberg – Copenhague, Danemark. Cette souche présente le génotype *MATa \_prc1 vpl1-1 leu2-3 leu2-112 ura3-52* (Nielsen et al, 1990). Cette souche modifiée est défectueuse pour l'adressage vacuolaire des protéines, qui sont alors excrétées dans le milieu. Elle est ainsi potentiellement capable de libérer dans le milieu extracellulaire les protéines présentant un signal d'adressage reconnu comme tel.

### **1.2.5. *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1**

La souche de levure *S. cerevisiae* INVSC1  $\alpha$  provient de chez Invitrogen. Cette souche présente le génotype : *MATa his3 $\Delta$ leu2 trp1-289 ura3-52/mata his3 $\Delta$ 1 leu2 trp1-289 Ura3-52* et comme phénotype : His-, Leu-, trp-, ura- (He et al., 2004).

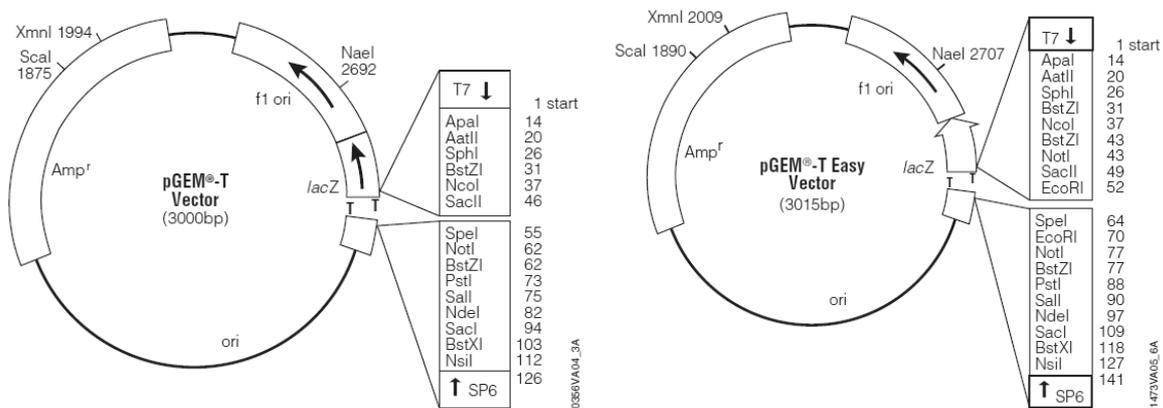
### **1.2.6. *Agrobacterium rhizogenes* A4**

Les différents vecteurs utilisés pour la transformation génétique ont été introduits dans la souche hypervirulente *A. rhizogenes* A4. La souche a été fournie par le Centre Français des Bactéries Phytopathogènes d'Angers (<http://www-intranet.angers.inra.fr>).

### 1.3. Plasmides

#### 1.3.1. *pGEM-T-easy* et *PGEM-T*

Les vecteurs pGEM-T-Easy® (3015 pb, Amp<sup>r</sup>) et pGEMT (3000 pb, Amp<sup>r</sup>) ® (Promega, Madison, Wisconsin, USA) ont été utilisés pour la plupart des sous clonages d'ADNc (Figure 18). Ils sont fournis sous leur forme linéarisée, une thymidine en position 3' bordant chaque extrémité du site de clonage. La présence de ces bases permet le clonage rapide des amplicons obtenus par PCR et possédant une adénosine en 3' du produit PCR amplifié. Les bactéries transformées par un plasmide ayant intégré l'insert d'intérêt peuvent être sélectionnées grâce au système «blanc/bleu» ou  $\alpha$ -complémentation. La séquence du peptide  $\alpha$  est interrompue par le Site de Clonage Multiple (Multiple Cloning Site, MCS).

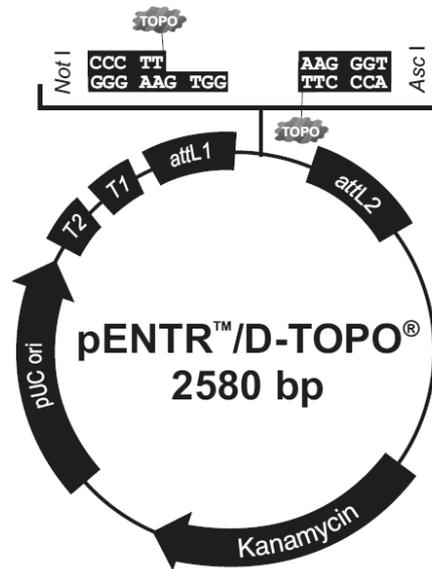


**Figure 18.** Représentation schématique des plasmides *pGEMT* et *pGEMT-easy*

En présence de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) et d'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside), les bactéries ayant intégré un plasmide vide ligé sur lui-même sont colorées en bleu, suite à l'hydrolyse du X-Gal par la  $\beta$ -galactosidase, tandis que les colonies bactériennes transformées par un plasmide recombinant sont blanches.

#### 1.3.2. *pENTR/D-TOPO*®

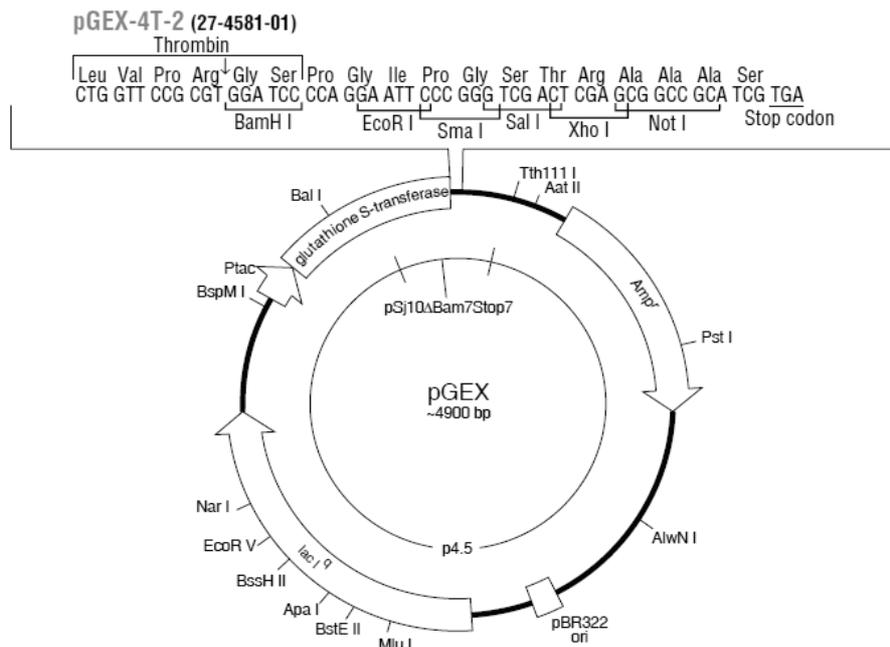
Ce vecteur, commercialisé par Invitrogen, utilise la technologie GATEWAY (Figure 19) Il est utilisé comme vecteur d'entrée pour cloner des produits PCR qui seront ensuite introduits par recombinaison homologue dans des vecteurs d'expression (Marsischky and LaBaer, 2004).



**Figure 19.** Représentation schématique du plasmide pENTR/ SD/D et de son site de clonage

### 1.3.3. PGEX- 4T-2

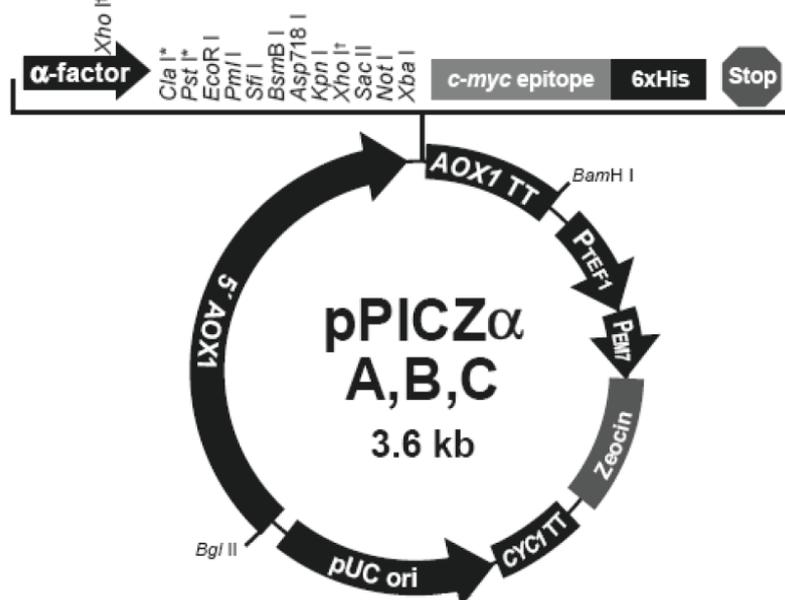
Le plasmide pGEX-4T2 (Amersham Pharmacia Biotech) (Figure 20) a été utilisé comme vecteur d'expression pour produire une protéine de fusion GST (glutathion- S- transférase) dans *E. coli*. Ce plasmide possède le gène conférant une résistance à l'ampicilline et le gène *GST* codant pour la glutathion transférase, ainsi qu'un site de clivage à la thrombine. La transcription du gène inséré dans le site multiple de clonage est placée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur *tac* inductible par l'IPTG, un analogue du lactose. Après l'induction, ce plasmide permet la surproduction de protéines recombinantes fusionnées à la GST (26 kDa) à leur extrémité N-terminale.



**Figure 20.** Représentation schématique du plasmide pGEX-4T-2 et de son site de clonage

### 1.3.4. pPIC $\alpha$ Z

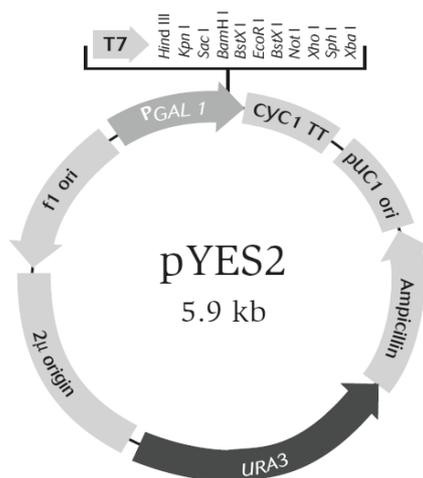
La carte du vecteur d'expression pPICZ $\alpha$ A fourni par Invitrogen est présentée en Figure 21. Outre le promoteur du gène *AOX1*, ce vecteur contient une séquence signal pour la sécrétion de la protéine d'intérêt, un site de clonage multiple permettant l'insertion du fragment d'ADNc désiré, un fragment de l'extrémité 3' du gène *AOX1* et le signal de terminaison de la transcription du gène *AOX1*. Il comprend également un marqueur de sélection, la résistance à la zéocine, permettant de cribler les bactéries et les levures transformées par le vecteur. Ce vecteur permet l'intégration de la cassette d'expression dans le génome de la levure par recombinaison homologue.



**Figure 21.** Représentation schématique du vecteur d'expression pPICZ $\alpha$  et de son site de clonage

### 1.3.5. pYES2

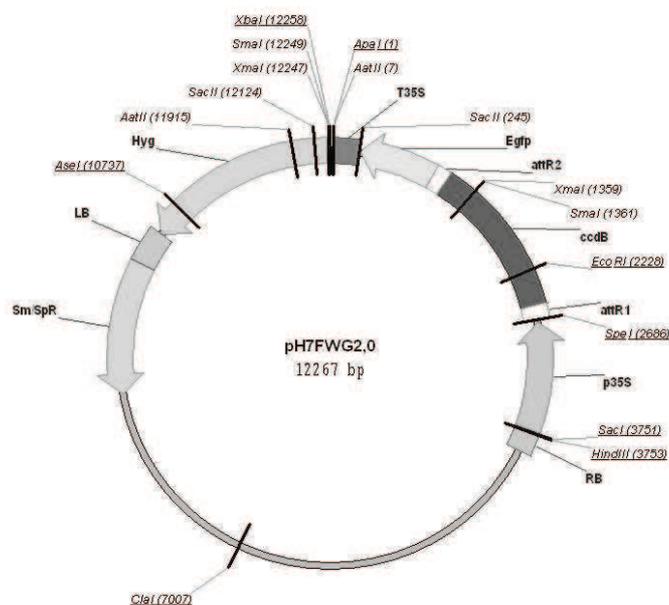
Le plasmide pYES2 (5,9 kb) est commercialisé par Invitrogen (Figure 22). Il permet la synthèse des protéines recombinantes dans plusieurs souches de *Saccharomyces cerevisiae* dont INVSc1 et W2579. Il renferme un promoteur *GAL1* inductible par le galactose qui contrôle l'expression du gène inséré. Il possède un site de clonage multiple situé en aval de ce promoteur. Il comprend également un signal de terminaison de transcription *CYC1* nécessaire à la stabilisation des ARNm, un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des transformants dans *E. coli*, et un gène *URA3* codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse d'uracile pour la sélection des levures transformées. Ce vecteur est muni de plusieurs origines de répllication pour maintenir le nombre de copies plasmidiques à un haut niveau.



**Figure 22.** Représentation schématique du vecteur d'expression pYES2 (Invitrogen).

### 1.3.6. Vecteur d'expression PH7FWG2

Ce vecteur a été utilisé pour la localisation subcellulaire des gènes. Ce vecteur contient le gène codant pour la protéine fluorescente GFP (Figure 23), et permet de cloner le gène d'intérêt en amont du gène codant pour la protéine fluorescente GFP.



**Figure 23.** Représentation schématique du vecteur d'expression pH7FWG2 (Karimi et al., 2002)

## 1.4. Conditions de culture

Les cultures sont réalisées en aérobiose soit à 37°C (*E. coli*) soit à 28°C (*A. rhizogenes A4*, *S. cerevisiae W2579*, *S. cerevisiae INVSc-* *Pichia pastoris X33*) sous agitation, dans des fioles d'erenmeyers stériles remplies au dixième de leur volume ou dans des tubes stériles de culture remplis au cinquième de leur capacité. Les milieux de culture utilisés et les diverses méthodes sont référencées dans l'annexe 2.

## 1.5. Conservation des souches

Toutes les souches d'*E. coli*, *A. rhizogenes* A4, *S. cerevisiae* W2579, *S. cerevisiae* INVSc et *Pichia pastoris* X33 sont cultivées pendant 1 nuit, puis mélangées à du glycérol (20% final p/v) et stockées à -80°C.

## 2. MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

### 2. 1. Extraction acides nucléiques

#### 2.1.1 Extraction d'ADN plasmidique

La méthode d'extraction d'ADN plasmidique à partir de cellules de *E. coli* est basée sur la lyse alcaline décrite par Birnboim et Doly (1979) et modifiée par Sambrook *et al.* (1989). Le principe consiste à dénaturer l'ADN génomique de haut poids moléculaire en milieu alcalin. Une fois les cellules lysées en présence d'hydroxyde de sodium, l'ADN chromosomique et les protéines sont éliminées par précipitation en présence d'acétate de sodium. L'ADN plasmidique est précipité par ajout d'éthanol absolu. Dans ce travail, les extractions d'ADN plasmidique ont été réalisées en utilisant le kit Wizard Kit DNA Extraction (Promega).

#### 2.1.2. Extraction d'ARN total

Pour chaque échantillon, 50 à 150 mg de poudre de baies ou de hairy roots congelées à -80°C sont décongelées durant 30 min en présence de 1 mL de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 8,3 2 M, PEG 4000 20 mg/mL, NaClO<sub>4</sub> 8M, SDS 20%, PVPP insoluble 85 mg/mL) β-mercaptoéthanol (10 μL.mL<sup>-1</sup>). L'extraction d'ARN est ensuite réalisée en utilisant le kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) avec les modifications suivantes : après incubation dans le tampon d'extraction, la totalité de l'échantillon est transférée dans la colonne QIA shredder, une centrifugation (2 min, 13000 g) est ensuite effectuée à température ambiante. Le filtrat est transféré dans un tube de 2 mL et 1 volume d'éthanol absolu est ajouté suivi d'une centrifugation (15 min, 13000 g) à 18°C. Le culot est alors repris dans 100 μL d'eau DEPC (Diéthyl Pyrocarbonate) traitée pour être RNase free, 350 μL de tampon RLT additionné de β-mercaptoéthanol (10 μL.mL<sup>-1</sup>) et mélangé par inversion. 250 μL d'éthanol absolu sont ajoutés et la totalité de l'échantillon est immédiatement transférée dans la colonne Rneasy, suivi d'une centrifugation (15s, 13000 g) à température ambiante. 350 μL de tampon RW1 sont ajoutés sur la colonne, avant centrifugation (15s, 13000 g) à température ambiante. Une solution de DNase composée de 70 μL de tampon RDD et 10 μL de DNase I (150 unités) est ajoutée au milieu de la colonne. Après incubation 15 min à température ambiante, 350 μL de tampon RW1 sont ajoutés à la colonne, suivi d'une centrifugation (15s, 10000 g) à température ambiante. Les étapes de lavage et élution ne sont pas modifiées. Les ARN sont

élués dans 35 µL d'eau DEPC. La quantification des ARN totaux est effectuée par fluorométrie à l'aide du réactif Ribogreen (Molecular probes, Leiden, Pays-Bas).

### **2.1.3. Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) pour PCR quantitative**

Les ARN totaux sont dénaturés à 65°C pendant 5 min en présence de dNTPs (10 mM) et de 500 ng d'amorces oligodT<sub>12-18</sub>, puis refroidis immédiatement dans la glace. Le mélange est ensuite incubé 1 h à 42°C en présence de DTT (10 mM), de 200 U de reverse transcriptase Superscript<sup>®</sup> II (Invitrogen, Carlsbad, CA) et de tampon (Tris-HCl 50mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM) dans un volume final de 20 µL. La réaction est arrêtée par dénaturation de l'enzyme à 70°C pendant 10 min. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

## **2.2. PCR**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier un fragment spécifique d'ADN, situé entre deux amorces prédéfinies (5 µM), en présence de dNTPs (10 mM) et d'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* Taq DNA polymérase (Sigma-Aldrich ou Advantage-HF2<sup>®</sup> Clontech, USA). 30 à 40 cycles d'amplification spécifique sont réalisés par réaction. Chaque cycle comporte 3 étapes :

- dénaturation du double brin d'ADN à 94°C pendant 1 min.
- appariement des amorces pendant 30s selon la température d'appariement déterminée pour chaque couple d'amorces.
- élongation des nouveaux brins d'ADN à 72°C (Taq Sigma) ou 68°C (Advantage-HF2<sup>®</sup>) pendant un temps déterminé selon la taille du fragment à amplifier.

### **PCR quantitative**

Les amorces pour la PCR quantitative ont été définies à l'aide du logiciel Primer 3 (Rozen et Skaletsky, 2000) avec les paramètres par défaut. Elles sont définies pour amplifier un fragment compris entre 100 et 300 pb. La spécificité des amorces est vérifiée en effectuant un BLAST de leur séquence sur la base de données TIGR Grape Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=grape>) (Release 6.0, July 2008) et du génome complet de *Vitis vinifera* (Vitis vinifera genome browser, <http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>). La PCR quantitative est réalisée à partir de 25 ng d'ADNc comme matrice, à l'aide du kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer Applied Biosystems) sur l'appareil 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Chaque réaction PCR est réalisée dans un volume final de 20

μL contenant 10 μL de SYBR Green Master Mix, 5 μM d'amorces et 25 ng d'ADNc. Une première étape consiste à l'activation de l'AmpliTaq Gold polymerase®

- 50°C pendant 2 min
- 95°C pendant 10 min

Chaque cycle comporte 2 étapes, 40 cycles sont réalisés:

- dénaturation du double brin d'ADN à 95°C pendant 15 s
- appariement des amorces et élongation des nouveaux brins d'ADN à 60°C pendant 1 min.

Pour chaque réaction PCR, une mesure de  $C_t$  (Threshold Cycle) est effectuée, correspondant au nombre de cycle au-delà duquel la quantité d'ADN amplifiée dépasse le seuil exploitable fixé par l'opérateur ou le logiciel dans notre cas. La courbe  $C_t = K$  (log nombre total de copies) est une droite de pente  $K = -1/(\log E)$ . Lorsque l'efficacité pour un couple d'amorce (E) est égale à 100%, la quantité d'ADN double à chaque cycle de PCR. Les niveaux relatifs d'expression sont calculés par rapport au niveau d'expression du gène codant le facteur d'élongation *EF1α* correspondant au gène GT181C12, dont l'expression est constante au cours du développement de la baie et dans les différents tissus (Terrier *et al.*, 2005). Les niveaux d'expression relatifs sont exprimés par la méthode du  $2^{-\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001) où  $\Delta C_t = C_{t\text{échantillon}} - C_{t\text{EF1}}$ . Cette méthode peut être utilisée lorsque les valeurs des efficacités des amorces sont égales. Des mesures de  $C_t$  de dilutions successives de fragmentw de PCR purifiés permettent d'établir une courbe d'étalonnage qui sert à déterminer l'efficacité de la réaction  $E = (10^{(1/K)})$ . Chaque réaction est réalisée en triple.

### 2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose afin de vérifier leur taille et/ou de les quantifier. Les gels d'agarose sont préparés à une concentration de 1% (p/v) TAE (Tris base – acide acétique 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) et en présence de bromure d'éthidium (BET, 0,5 μL.mL<sup>-1</sup> de gel). Les échantillons sont additionnés à 0,2 volumes de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25% (p/v), xylène de cyanol FF 0,25% (p/v), glycérol 30% (p/v) avant dépôt sur le gel. La migration s'effectue dans un tampon de migration TAE à 100 V pendant 20 min. Les fragments d'ADN sont visualisés sous éclairage ultraviolet grâce au BET. La taille et la concentration des fragments d'ADN séparés sur le gel sont estimées grâce à un marqueur de taille migrant en parallèle des échantillons sur le gel (gamme étalon MW-1700 Smart Ladder, Eurogentec).

### 2.4. Extraction de fragments d'ADN à partir de gel d'agarose

Cette technique permet de récupérer des fragments d'ADN à partir d'un morceau de gel d'agarose à bas point de fusion (NuSieve®). Après électrophorèse selon la méthode décrite par

Vogelstein et Gillespie (1979), les fragments d'ADN sont découpés rapidement dans le gel puis purifiés par adsorption-élution à l'aide du kit Wizard Kit SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

## 2.5. Séquençage et amorces nucléotidiques

Avant toute transformation de plante ou de microorganisme pour la production de protéines recombinantes, l'insertion de la séquence d'intérêt dans le vecteur est vérifiée par PCR puis par séquençage. Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur Applied Biosystem (GATC) en utilisant les amorces adéquates. Le logiciel ClustalW2 alignement algorithme (Thompson *et al.*, 1994) a permis l'alignement de l'ensemble des séquences. Elles ont également été comparées par recherche de similarités avec des séquences de GENBANK à l'aide de l'outil de comparaison de séquences nucléotidiques ou protéiques BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant le logiciel MEGA4 package (Kumar *et al.*, 2004).

**Tableau 3.** *Amorces utilisées lors de l'étude des VvGTs*

Purpose	Nom des amorces	Sequence 5'-3'	Forward ou Reverse	Site de Restriction
PCR Quantitative	VvGT1expF	TTGAAGGGACACGTGTGAAG	F	-
	VvGT1expR	GAAACAAACAGGTTGCGTGA	R	-
	VvGT2expF	ATTTTGATGTAGCGTGAAATAAG	F	-
	VvGT2expR	TGGGTGACAAACTAGGGAAA	R	-
	VvGT3expF	TGAGTATGGTGCTGGTTTGC	F	-
	VvGT3expR	ACGCTACATCGTGACTCCTG	R	-
Clonage dans PGEX-4T2 pour production de protéine de fusion GST	VvGT1pGEXstart	<i>GGATCC</i> <u>ATGGG</u> ATCTGAATCAAAGCTA	F	BamHI
	VvGT1pGEXstop	<i>GCGGCCGCTTAAATTTT</i> GTTTTGTAAATG	R	NotI
	VvGT2pGEXstart	<i>GGATCC</i> <u>ATGGG</u> GTTCTGAATCAAAGCTAG	F	BamHI
	VvGT2pGEXrev	CTTATTTACGCTACATCAAAAT	R	
	VvGT2pGEXstop	<i>GCGGCCGCTCAAATTTT</i> CCTTTGACTTGCA	R	NotI
	VvGT3pGEXstart	<i>GGATCC</i> <u>ATGGG</u> TCTGAATCAAAGCTAG	F	BamHI
	VvGT3pGEXstop	<i>GCGGCCGCTCAAATTTT</i> GTTTACTGGCA	R	NotI
Clonage dans Topo pour la construction de la protéine de fusion GFP	VvGT3locaTOPOF	CACCA <u>ATGGG</u> TCTGAATCAAAGCTAG	F	-
	VvGT3locaTOPOR	AATTTTGTTTGACTGGCAAACCAG	R	-

**Tableau 4.** Amorces utilisées lors de l'étude des VvGATs

Purpose	Nom des amorces	Sequence 5'-3'	Forward ou Reverse	Site de Restriction
PCR Quantitative	GAT1PCRQF	GTGGTTTTGGGTTCAACAGG	F	-
	GAT1PCRQr	CTCCCCTTGAGGACCTTCAT	R	-
	GAT1bisPCRQF	TGACTTATGCGACCGTGAAG	F	-
	GAT1bisPCRQr	TCCCCTTGAGGACCTTCATA	R	-
	GAT2 PCRQF (GATA003QPCRF)	TTCGTAGCCAGCTTGGTTCT	F	-
	GAT2PCRQr (GATA003QPCRR)	CCATTGATCAAAGCCCAAGT	R	-
Clonage dans PGEX- 4T2 pour production de protéine de fusion	GAT1pgexstart	<u>GTCGACTGGTTCCATCGTCGAGTATCTG</u>	F	Sall
	GAT1pgexstop	<u>GCGGCCGCTTATTTACTTTCAATTTGGCA</u>	R	NotI
Clonage dans Topo pour la construction de la protéine de fusion GFP	GAT1bislocatopoF	CACCATGGCTGCAAAAAGGCCATCC	F	-
	GAT1bislocatopoR	GAGAGGGTAGTAATGCACCCACC	R	-
Clonage dans pPicaA pour production dans <i>Pichia pastoris</i> X33	GAT1ssPSPICFlg	GATCGAATTCGGTTCCATCGTCGAGTATCTG	F	EcoRI
	GAT1stopecoRI	GATCGAATTCCTTATTTACTTTCAATTTGGCA	R	ECOR1
Clonage dans pYES2 pour production dans <i>S.Cerevisiea</i> W2579 et INVSc	GAT1BisF-Pyes2	<u>GAATTCAAAAAAATGGCTGCAAAAAGGCCATCCAATTC</u>	F	EcoRI
	GAT1BisRStop-pYE	<u>CTCGAGCTAGAGAGGGTAGTAATGCACCCACC</u>	R	XhoI

## 2.6. Ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur

Après clonage dans pGEM-T ou pGEM-Teasy, les ADNc d'intérêt sont libérés en utilisant les enzymes de restriction dont les sites de reconnaissance ont été ajoutés dans les amorces (Tableau 3, Tableau 4). Le vecteur de destination est digéré avec les mêmes enzymes. Les fragments digérés sont purifiés sur gel Nusieve.

Les réactions de ligation des fragments d'ADN dans les divers plasmides ont été réalisées en présence d'1 unité d'ADN ligase T4 (Roche), de tampon Roche ligase 1X, de 125 ng de vecteur digéré et d'une quantité d'insert équivalente à un ratio molaire [insert: vecteur] de [3:1]

## **2.7. Recombinaison homologue par la technologie GATEWAY (Invitrogen)**

Cette technique est une méthode de clonage par recombinaison homologue développée à l'origine par Life Technologies, Inc (Hartley *et al.*, 2000) et commercialisée aujourd'hui par Invitrogen. Ce système est basé sur le système de recombinaison du bactériophage  $\lambda$  dans *E. coli*. Le clonage se fait en deux étapes:

Le fragment d'ADNc à cloner est amplifié par PCR en ajoutant les 4 bases CACC à l'extrémité 5' de l'amorce forward pour permettre un clonage directionnel. L'insertion du fragment dans le vecteur s'effectue à 22°C pendant 1 h dans 6  $\mu$ L de mélange réactionnel contenant 1  $\mu$ L de Buffer solution saline (Invitrogen) et en présence de 15 ng de vecteur pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) et une quantité de produit PCR égale à [ng de vecteur pENTR/D x taille insert / taille du vecteur pENTR/D]. A l'issue de cette réaction on obtient un clone dit "clone d'entrée", qui servira ensuite de substrat pour la réaction de recombinaison LR (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

Le fragment d'ADN d'intérêt cloné dans TOPO est ensuite transféré dans un vecteur de destination sélectionné permettant l'expression de l'ADNc. Cette réaction s'effectue pendant une heure à 25°C dans 4  $\mu$ L de mélange réactionnel en présence de 100 ng de vecteur pENTR/D contenant le fragment d'intérêt, 100 ng de vecteur d'expression, 0,8  $\mu$ L d'enzyme LR clonase II (Invitrogen) et du tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7). La réaction est arrêtée en ajoutant 0,8  $\mu$ L de protéinase K (Invitrogen) au mélange réactionnel incubé pendant 10 min à 37°C.

## **2.8. Techniques de transformation**

### ***2.8.1. Transformation d'E. coli par choc thermique***

50  $\mu$ L de cellules compétentes DH5 $\alpha$ <sup>®</sup> sont décongelées sur de la glace puis mélangées à la totalité du produit de ligation ou de recombinaison homologue et incubées durant 30 min dans la glace. Le mélange est transféré à 42°C pendant 45 s puis à nouveau refroidi pendant 5 minutes sur la glace. Ensuite, 400  $\mu$ L de milieu SOC sont ajoutés au mélange réactionnel et la culture est incubée 1 h à 37°C sous agitation. La suspension est étalée sur un milieu sélectif. La boîte est incubée une nuit à l'étuve à 37°C.

### ***2.8.2. Transformation de S. cerevisiae par choc thermique***

Au cours de cette manipulation, les levures sont rendues compétentes par traitement aux sels de lithium. L'ADN exogène peut alors pénétrer dans la cellule au cours d'un choc thermique. Le protocole utilisé est celui décrit par Ito *et al.* (1983) avec quelques modifications.

Une culture de *S. cerevisiae* est réalisée dans 20 mL de milieu YPD (Yeast extract Peptone Dextrose Medium) pendant une nuit. Le lendemain lorsque la  $DO_{600}$  du milieu de culture atteint 1, la culture est centrifugée à 4°C (2500 g, 5 min). Le culot est lavé en le resuspendant dans 40 mL d'H<sub>2</sub>O stérile, puis centrifugé à 4°C pendant 5 min à 3000 rpm. Le culot est ensuite repris dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O stérile puis aliquoté dans des eppendorfs par fraction de 100 µL placés dans la glace.

Pour chaque transformation, on ajoute dans l'eppendorf, 240 µL PEG 4000 (50% p/v), 36 µL de LiOAc (1M), 10 µL d'ADN de sperme de saumon (5 mg.mL<sup>-1</sup>) préalablement soniqué et dénaturé 3 min à 95°C et la solution d'ADN à transformer à raison de 0,1 à 1µg. L'ensemble est mélangé vigoureusement, puis incubé 30 min à 30°C sous une faible agitation. Le choc thermique est réalisé durant 20 min à 42°C. L'ensemble est ensuite centrifugé et le surnageant est éliminé avec précaution puis le culot est repris dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O stérile. Un premier étalement de 100 µL est réalisé sur un milieu SD ura, 20% glucose gélosé. Les 900 µL restant sont à nouveau centrifugés, puis repris dans 200 µL d'H<sub>2</sub>O stérile et étalés sur le même milieu.

### **2.8.3. Transformation des levures *Pichia pastoris* par électroporation**

Les cellules de *Pichia pastoris* sont transformées par électroporation. Une suspension de cellules et d'ADN est soumise à une décharge électrique de haut voltage qui perméabilise la membrane, permettant le passage de macromolécules chargées telles que l'ADN. Cette technique est applicable à de nombreux types cellulaires, dont ceux réfractaires aux techniques classiques de transformation comme les levures *Pichia pastoris*.

#### *2.8.3.1. Préparation des cellules compétentes*

Une colonie de la levure *P. pastoris* (souche X33 sauvage sensible à la zéocine), isolée sur boîte YPD, est mise en pré-culture dans 5 mL de YPD à 30°C sous agitation à 225 rpm. Cent µL de la première pré-culture sont inoculés dans 20 mL de milieu YDP, le milieu liquide est incubé une nuit dans un erlenmeyer 20 mL (30°C, 250 rpm). Le lendemain, un erlenmeyer de 2L contenant 500mL du milieu YPD est inoculé avec 0.5 mL de la 2<sup>ème</sup> pré-culture. La culture est maintenue sous agitation 16h à 30°C. Lorsque le  $DO_{600}$  atteint une valeur comprise entre 1,9 et 2,3, l'extrait est centrifugé pendant 5 min à 1500 g et le culot est repris dans 500 mL d'eau stérile froide (+4°C). Le mélange est à nouveau centrifugé à 1500g pendant 5min et le culot est repris avec 20 mL de sorbitol 1M froid (+4°C). Après une dernière centrifugation, le culot est resuspendu dans 1mL de sorbitol (1M) froid.

### 2.8.3.2. Transformation des cellules compétentes

Dans une cuve d'électroporation, 80  $\mu\text{L}$  de cellules compétentes ( $\text{DO}_{600} = 1,5$ ) sont mélangés avec 0.5 à 1  $\mu\text{g}$  du plasmide recombinant pPICZ $\alpha$ /Insert qui a été linéarisé par une enzyme adéquate et purifié. Le mélange est mis à incuber 5 minutes sur la glace. Une décharge électrique (1,5 kV, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ ) est ensuite appliquée dans la cuvette d'électroporation pendant quelques millisecondes. Après l'addition de 1mL de sorbitol 1M (froid +4°C), le mélange est transféré dans un eppendorf de 2mL et les cellules sont incubées dans l'étuve à 30°C pendant 2 heures (sans agitation). Les levures sont ensuite étalées sur des boîtes YPDS + zéocine (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) à raison de 250  $\mu\text{L}$  par boîte. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 2 à 3 jours, jusqu'à apparition des colonies.

### 2.8.4. Transformation des *Agrobacterium rhizogenes* A4 par électroporation

#### 2.8.4.1. Préparation des bactéries compétentes

Une préculture d'*Agrobacterium rhizogenes* est effectuée dans 3 mL de milieu MGL/biotine à partir d'un prélèvement d'agrobactéries sur boîte MGL/biotine/rifampicine et mise à pousser pendant la nuit à 28°C sous agitation (225 RPM). Trois millilitres de la préculture sont ensemencés dans 300 mL de milieu MGL/B liquide et la culture est mise à pousser à 28°C sous agitation jusqu'à atteindre une  $\text{DO}_{600}$  entre 0,5 et 0,8. Le culot d'agrobactéries est alors refroidi dans la glace durant 15 et 20 minutes avant d'être centrifugée 15 minutes à 4000g à 4°C. Le culot de cellules est lavé 2 fois avec 10 mL de HEPES 1mM à pH7 et une fois dans 10 mL de glycérol 10% (v/v), puis remis en suspension dans 2 mL de glycérol stérile 10% (v/v) à 4°C. Les agrobactéries sont par la suite aliquotées par 40  $\mu\text{L}$  puis stockées à -80°C. Un tube sera utilisé pour chaque transformation.

#### 2.8.4.2. Transformation des bactéries compétentes

40  $\mu\text{L}$  d'*Agrobacterium rhizogenes* A4 rendues compétentes sont mises à décongeler dans la glace. Un  $\mu\text{L}$  d'ADN (30  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) est ajouté et le tout incubé pendant 10 min dans la glace. Le mélange est ensuite introduit dans une cuvette d'électroporation froide et stérile et incubé pendant 30 min dans la glace. Une décharge électrique (2,5 kV, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ ) est ensuite appliquée dans la cuvette d'électroporation pendant quelques millisecondes. 1 mL de milieu MGL/B est ajouté au mélange réactionnel. Après 2-3h d'incubation à 28°C sous agitation, les cellules sont étalées sur un milieu gélosé et sélectif (MGL/B 50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  spectinomycin). Les boîtes de culture sont placées à 28°C pendant 72 h.

### **2.8.5. Transformation de vitroplants de vigne par *A. rhizogenes* A4**

Une culture d'*A. rhizogenes* A4 contenant le plasmide d'intérêt est étalée sur milieu MGL/B gélosé et sélectif, puis placée à 28°C pendant 72 h. Un petit prélèvement d'agrobactéries est remis en suspension dans 5 ml de milieu MS/2 (Murashige and Skoog) additionné de 100 mM d'acétosyringone. Lorsque la  $DO_{600}=0,3$ , le mélange est maintenu en agitation jusqu'à l'inoculation. Les vitroplants à transformer ont été préalablement repiqués dans du milieu MS/2 solide afin qu'ils aient développés au minimum 5 nœuds. Une pince est introduite dans la solution d'*A. rhizogenes* et les vitroplants sont pincés au niveau du 5<sup>ème</sup> nœud de la tige. Les vitroplants transformés sont placés en chambre de culture à 28°C jusqu'à apparition d'un cal à l'endroit de l'infection. Les cals sont alors déposés sur du milieu LGO additionné de céfotaxime 200  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  et d'Augmentin 200  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  comme décrit dans Torregrosa and Bouquet (1997) avec 250  $\text{mg L}^{-1}$  d'hydrolysate de caséine et solidifié avec l'ajout de 5  $\text{g L}^{-1}$  Phytigel [Sigma]. Lorsque des clones racinaires apparaissent au niveau des cals, ils sont transférés sur du milieu LGO additionné de céfotaxime et d'Augmentin). Les racines sont ensuite repiquées toutes les 3 semaines, sur ce même milieu.

## **3. PRODUCTION DE PROTEINES**

### **3.1. Expression chez les procaryotes (*E. coli*)**

#### **3.1.1- Induction de la synthèse de la protéine recombinante**

Les plasmides d'expression des diverses protéines de fusion GST ont été transformés dans la souche bactérienne d'*Escherichia coli* BL21(DE3) (Stratagene, La Jolla, California, USA). Les cellules bactériennes sont cultivées dans du LB en présence d'ampicilline à 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , 16h à 37°C. Trois mL de la culture ont été inoculés dans 120 mL de YTA 2X contenant 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  d'ampicilline. L'expression de la protéine recombinante par les cellules d'*E. coli*, est induite lorsque la culture bactérienne atteint une  $DO_{600} = 0,8$ , par ajout d'isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) à une concentration finale de 0.1mM et la culture est poursuivie 24 heures à TA sous 225 rpm d'agitation.

#### **3.1.2. Préparation du lysat cellulaire bactérien**

Les bactéries sont ensuite récoltées et centrifugées à 8000g à 4°C. Le culot bactérien est resuspendu avec 2mL de PBS (Phosphate Saline Buffer,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3mM, NaCl 120 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), additionné de 0.1% (v/v)  $\beta$ - mercaptoéthanol, 1% (v/v) Triton X-100 et de lysozyme (1mg. $\text{mL}^{-1}$  final). La suspension cellulaire est ensuite placée dans un bain de glace saturé en NaCl (-5°C) puis broyée par ultrasonication durant 5 min à l'aide d'un sonicateur (Branson Sonifier 250) dans les conditions suivantes: puissance des

ultrasons de 50 Watts (output 5), période d'ultrasonication de 30 % (duty cycle 30) et diamètre de sonde de 20 microns.

### **3.1.3. Purification de l'enzyme**

Le broyat est centrifugé à 12 000g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est incubé en présence de résine *Glutathione – Sepharose*<sup>TM</sup> 4B (GE Healthcare) pendant 30 minutes à TA sous agitation douce. Trois lavages sont effectués avec du tampon PBS puis les protéines de fusion et la résine sont incubées pendant 16h à TA en présence de thrombine dans le but de cliver la protéine de fusion et ainsi libérer la protéine en aval de la GST. L'extrait contenant les protéines recombinantes libérées est ensuite aliquoté et stocké à -20°C en présence de 10% de glycérol.

## **3.2. Expression chez les Eucaryotes (*Pichia Pastoris*, *S. cerevisiae* W2579 et *S. cerevisiae* INVSc)**

### **3.2.1. Culture en mode micro-fermenteurs (blastula) de *Pichia pastoris***

La technique de culture en micro-fermenteurs a pour objectif de tester et comparer la production de protéines hétérologues, produites par les différents clones contenant la *VvGATI*. C'est une technique de culture en fermenteur batch/fed-batch de petit volume, où le pH et la température sont régulés. Les expériences ont été effectuées à la halle commune de l'UMR SPO et l'UMR IATE.

Après la vérification par PCR de l'intégration des ADNc dans le génome de *Pichia pastoris* avec des amorces spécifiques, 2 pré-cultures successives de levures sont effectuées sur de l'YPD.

Les cultures sont réalisées dans des tubes souples à usage unique de 13 mL munis d'un bouchon étanche qui est percé pour l'aération, par un capillaire inox. Chaque tube contient 5 mL de milieu synthétique pour *P. pastoris* (Cf Annexe 2),ensemencé avec 100µL de pré-culture. Ces derniers sont placés dans un bain-marie à 28°C et sont reliés au système d'aération.

L'air filtré est injecté dans les tubes de culture par l'intermédiaire d'un système de tubulure. Deux réservoirs permettent la répartition équitable des débits d'air, la régulation du pH et l'induction par le méthanol (fed-batch). Les deux réservoirs, placés dans un bain-marie à 25°C, contiennent 600mL d'eau ultrapure et 1 mL d'ammoniaque (NH<sub>4</sub> à 32%) et l'un des deux contient en plus 19.2 mL de méthanol. L'air passe séquentiellement par l'un, puis l'autre des réservoirs (sélection des systèmes de tubulure par pince de Mohr). L'ammoniaque et le méthanol sont entraînés dans les tubes de culture par le débit d'air.

La culture se déroule en deux phases : la première phase de 48 heures, permet une production de biomasse, par consommation du glycérol contenu dans le milieu de culture (Batch). L'air passe par le réservoir qui contient uniquement de l'eau et de l'ammoniac.

La deuxième phase dure 96 heures. C'est la phase de production de protéines par induction avec le méthanol. L'air passe par le deuxième réservoir qui contient, en plus de l'eau et de l'ammoniac, le méthanol.

### **3.2.2. Culture en bioréacteur de *Pichia pastoris***

#### *3.2.2.1. Pré-culture en erlenmeyer*

Trois pré-cultures sont réalisées : 10 mL de milieu riche YPD sontensemencés à partir des colonies contenant notre gène d'intérêt. Cette première pré-culture est utilisée pourensemencer 20 mL de milieu MS *Pichia* qui est à son tour utilisé pourensemencer 200 mL du même milieu MS *Pichia*. Cette dernière pré-culture, après 12 h d'incubation est utilisée pourensemencer au 1/10<sup>ème</sup> la culture batch en fermenteur.

#### *3.2.2.2. Culture en fermenteur en mode fed- batch*

L'objectif des cultures fed-batch est la production de biomasse à forte concentration. Il s'agit d'alimenter en milieu de culture sans par ailleurs soutirer un quelconque volume de suspension cellulaire. Les cultures fed-batch peuvent être pilotées à taux de croissance constant ou variable. Le débit d'alimentation est couplé à la croissance exponentielle. Il est programmé par intervalle de temps ( $dt = 6$  h) de manière à suivre une régression de type exponentielle. Les expériences ont été effectuées à la halle commune de l'UMR SPO et l'UMR IATE.

Pour obtenir une culture fed- batch, le débit d'alimentation était maintenue constante. La vitesse spécifique de croissance décroît en fonction du temps (Annexe 3).

Au cours de chaque culture en fed- batch, le pH a été régulé à 6 durant toute la culture et la température maintenue à 29°C. Des prélèvements ont été effectués au cours de la fermentation afin de suivre la cinétique de production de la protéine.

A la fin de la fermentation, les cultures sont centrifugées à 13500xg durant 10 min à 4°C, lavées plusieurs fois avec de l'eau MilliQ et puis stockées à -20°C avec 10% (v/v) de glycérol.

#### *3.2.2.3. Cultures des *S. cerevisiae* W2579 et *S. cerevisiae* INVSc1*

Les cellules des *S. cerevisiae* W2579 contenant pYES2 et pYES2-ADNc d'intérêt ont été cultivées dans du milieu SD (Synthetic Dextrose) sans uracile contenant 2% glucose. Lorsque la DO<sub>600</sub> a atteint une valeur comprise entre 0.8 et 1.5, le volume de culture à inoculer dans le

milieu inducteur est calculé de façon à avoir une  $DO_{600}$  de départ à 0.4. Le volume d'ensemencement calculé est prélevé et centrifugé à 1500g durant 5 min à 4°C et repris dans le milieu d'induction (SD sans uracile, 2% galactose). La culture est maintenue sous agitation à 30°C. 16h plus tard, les cultures sont récoltées et centrifugées à 3000g pendant 10 minutes à 4°C. Dans le cas des cultures avec la souche INVSc1, le culot est lavé plusieurs fois avec 500µl d'H<sub>2</sub>O stérile et le surnageant est éliminé. Dans le cas des cultures avec la souche W2579, le surnageant est conservé.

#### **4. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES**

##### **4.1. Diafiltration**

Lorsque nécessaire, les extraits protéiques produits sont concentrés et lavés à 2 reprises avec du tampon sur un centricon à membrane millipore de seuil de coupure 5 000 Da. Cette opération se déroule à 4°C sous centrifugation.

##### **4.2. Dosage des protéines par la méthode Bradford**

Les protéines sont dosées d'après la méthode de Bradford (1976). Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique détectant le changement de couleur du bleu de Coomassie à 595 nm, après complexation avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la solution. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, et donc à la concentration en protéines dans l'échantillon. Une courbe étalon est réalisée avec une solution étalon de Sérum Albumine Bovine (BSA, Sigma) à 1g.L<sup>-1</sup>, en mettant 0 à 18 µl de BSA en présence de 1 ml de réactif (Bleu de coomassie G250 100mg .L<sup>-1</sup>, éthanol 95% (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) 50ml.L<sup>-1</sup>, Acide phosphorique 85% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 100ml.L<sup>-1</sup>).

##### **4.3. Préparation du gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et migration**

L'électrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Laemmli *et al.*, 1970) permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Le SDS permet la dénaturation et la solubilisation des protéines. La fixation des molécules de SDS sur les protéines, chargées négativement, masque leur charge intrinsèque de sorte que les polypeptides sont séparés en fonction uniquement de leur masse moléculaire.

L'échantillon protéique est dilué deux fois avec du tampon de charge (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 4% (p/v), glycérol 20% (v/v), β-mercaptoéthanol 10% (v/v), bleu de bromophénol 0,1% (p/v)). Les protéines sont ensuite dénaturées à 70°C pendant 30 min. Le gel est constitué de polyacrylamide réticulé par inclusion de méthylène-bis-acrylamide. La polymérisation

s'effectue en présence de persulfate d'ammonium et de TEMED (N,N,N,N'-tetramethylenediamine). Les protéines sont d'abord concentrées et déposées sur un gel (stacking gel à 4% d'acrylamide) puis séparées dans un gel dit de séparation (running gel à 11% d'acrylamide). Le tampon de migration est composé de Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3. La migration s'effectue à 20 mA pendant 30 min puis à 30 mA durant environ 1h30. Après migration, le gel est incubé toute une nuit dans une solution de bleu de Coomassie R250 0,1% (p/v), méthanol 40% (v/v) et acide acétique 10% (v/v). Le gel est ensuite décoloré dans une solution de méthanol, acide acétique et H<sub>2</sub>O (40/10/50 ; v/v/v). Le gel est par la suite enveloppé entre deux feuilles de cellophane avec quelques gouttes d'eau et conservé à 4°C.

#### **4.4. Analyse protéomique des séquences**

Le protocole de digestion protéolytique par la trypsine est adapté de Jensen (1999). Afin d'éviter une contamination par les kératines, des précautions doivent être prises : utilisation de matériel neuf ou extrêmement propre, port de gants stériles, manipulation sous hotte. Les analyses ont été effectuées au laboratoire de Protéomique Fonctionnelle, INRA, Montpellier.

##### ***4.4.1. Digestion trypsique dans le gel***

Les bandes d'intérêt sont soigneusement excisées en morceaux d'1 ou 2 mm<sup>3</sup> et placées dans des eppendorf de 1,5 mL. Elles sont lavées deux fois 20 minutes dans de l'eau MilliQ (MQ) puis dans 25mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (bicarbonate d'ammonium) (300µL) sous agitation. Les morceaux de gels sont ensuite incubés pendant 15 minutes dans 300 µL de 50% acétonitrile - 50 % hydrogénocarbonate (expulsion de l'eau et des sels dissouts). Les morceaux de gels sont ensuite déshydratés par l'ajout de 300 µL de CH<sub>3</sub>CN (Acétonitrile) à 100% et puis lyophilisés jusqu'à évaporation totale sous une température de 37°C pendant 1h. Une réaction de réduction au DTT (10mM, 45 min, 57 °C), et une réaction d'alkylation à l'iodoacétamide (55 mM, 30min, TA) des cystéines sont par la suite effectuées. Un lavage à l'eau MQ (300µL) est ensuite réalisé puis deux lavages dans 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (300µL) sous agitation précéderont une lyophilisation jusqu'à évaporation totale.

La réhydratation des morceaux de gels déshydratés est opérée avec 30µL d'une solution composée de trypsine à 12,5 ng/µL dans 25 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>.

40µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (25 mM) sont à nouveau ajoutés et la solution est placée pendant la nuit à 37°C sous agitation. L'élution a lieu avec 200µL du mélange acétonitrile/acide formique (75%/2%, v/v).

Les peptides sont soniqués pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons et le surnageant est transféré dans un eppendorf de 0,5 mL et l'ensemble est évaporé au speed-vac.

Les peptides sont ensuite resuspendus avec 10  $\mu$ L d'acide formique 2% et introduits dans des tubes en polypropylène pour analyse en HPLC.

#### 4.4.2. Spectrométrie de masse

Les protéines digérées ont été analysées par spectrométrie de masse HCT (High Capacity ion trap mass spectrometer) appelée aussi piège à ions quadripolaire (Esquire HCT; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Allemagne), relié à un système nano-HPLC-Chip Cube (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Le terme Chip décrit la partie réutilisable et amovible de l'interface HPLC-Chip-Cube-MS intégrant une pré-colonne d'enrichissement, une colonne de séparation, le nébulisateur nanospray et l'ensemble des connections nécessaires (Zorbax 300SB-C18; Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Les échantillons sont d'abord chargés dans la cartouche de 4 mm traversée par un débit de 4 $\mu$ L/min avec 0,1% d'acide formique (v/v). Après une pré-concentration, les peptides sont séparés sur la colonne (75  $\mu$ m de diamètre, 43 mm de longueur) sous un débit de 0,3  $\mu$ L / min pendant 30 min en utilisant un gradient linéaire de 3% à 45% d'acétonitrile dans 0,1% d'acide formique. Une tension capillaire de 1,8- 2,1kV dans le mode d'ionisation positive a été utilisée avec un débit de gaz sec de 4,5 L/min à 250 ° C.

Un premier balayage du spectre de masse a permis une observation successive de tous les ions se trouvant entre 310 m/z et 1800 m/z. Un second balayage à haute résolution a été effectué dans le but de mesurer précisément la masse des trois principaux ions figurant dans l'analyse précédente. Enfin, une troisième analyse s'est avérée nécessaire pour acquérir la collision provoquée par les spectres MS/MS des ions sélectionnés. Les données sont ensuite traitées en utilisant un logiciel de traitement de données (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) afin de visualiser les pics monoisotopiques d'intérêt.

La liste des séquences peptidiques obtenues a été confrontée, grâce au moteur de recherche Mascot (v. 2.2.04; Matrix Science, London, U.K.), aux séquences protéiques de la base de données *Vitis vinifera* et de la base NCBI (NCBI nr, à la date du 2010\_10\_18). Les paramètres d'analyse sont définis en laissant une tolérance d'un oubli, d'un seuil de coupure par la trypsine, en tenant compte de la probabilité de carbamidomethylation des cystéines (modifications fixes), de l'oxydation de la méthionine (modifications variables) et en laissant une tolérance de masse de 0,6 Da pour la MS et la MS/MS.

Sous ces conditions, les scores individuels requis pour les ions détectés doivent être supérieurs à 56 (pour la banque NCBI) et 30 (pour la banque *Vitis*) afin de pouvoir affirmer une identité avec une probabilité de 95%. Les protéines sont alors présumées valides si elles montrent au moins un peptide ayant un score au-delà de ces seuils.

#### **4.5. Hydrolyse en milieu basique**

La réaction d'hydrolyse alcalin (aussi appelée saponification) a été effectuée en utilisant 1N (concentration finale) de NaOH. Le mélange a été incubé durant une 1h à température ambiante, puis neutralisé avec de l'acétate de sodium 3M (concentration finale) à pH5.2

#### **4.6. Analyse par HPLC**

Pour identifier les produits issus des réactions enzymatiques effectuées avec les VvGTs et les VvGATs, une analyse chromatographique a été effectuée sur une chaîne HPLC Alliance 2690 (Waters, Milford, MA), équipée d'un détecteur à barrettes de diodes 2996 (Waters). La séparation a été réalisée sur une colonne de type C18 Atlantis (Waters, Milford, MA; 5 µm, 250x2.1mm) à 30°C. Les phases mobiles utilisées étaient : 100 % H<sub>2</sub>O (solvant A) et H<sub>2</sub>O/acétonitrile (20/80, v/v) (solvant B). L'élution a été effectuée à un débit de 0,25mL/min avec le gradient suivant : 0% B isocratique pendant 2 minutes, gradients linéaires de 0-2% B (2-10 min), 2-8% B (10-20 min), 10-20% B (30-40 min), 20-30% B (40-45 min), 30-40% B (45-50 min). Toutes les analyses ont été réalisées en triple. Les produits de réactions ont été identifiés selon leurs spectres UV, leur temps de rétention et leur spectre de fragmentation. Les analyses en HPLC et en spectrométrie de masse ont été effectuées avec l'aide de la plateforme de l'UMR SPO et des membres de l'équipe Biosynthèse des Polyphénols.

#### **4.7. Spectrométrie de masse**

Les analyses ont été effectuées sur un spectromètre de masse à trappe d'ions (Thermo Finnigan LCQ Advantage) équipé d'une source d'ionisation électrospray (San Jose, USA). Les analyses ont été réalisées en mode négatif, sur une plage de masse de 100 à 2000uma. La température de l'interface a été maintenue à 300°C, les débits des gaz vecteur et sécheurs étaient respectivement de 35 et 5 unités, et la tension de l'aiguille de 3KV. La MS/MS a été réalisée avec une énergie de collision de 35%.

#### **4.8. Analyse par électrophorèse capillaire**

Les produits de réaction formés ont été quantifiés par électrophorèse capillaire Beckman P/ACE MDQ 5500 CE unit couplée à une détection laser (CE-LIF). L'analyse en électrophorèse capillaire a été réalisée dans un tampon H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (acide borique) (25 mM) à pH=8 (ajusté avec du NaOH 1M), sous un voltage de 30 Kvolts, et un courant de migration de 40.1µA contrôlé par effet Peltier à 30 °C. La migration s'effectue en parallèle dans un tube capillaire de silice fondue (75 cm x 75 µm I.D x 375µm O.D), protégée par une gaine en aluminium. Le système optique est constitué d'une lampe au deutérium, la cellule de détection comporte un filtre UV à 214 nm, utilisé pour le dosage des produits issus des

réactions avec les VvGTs et un autre filtre UV à 280 nm pour le dosage des produits issus des réactions avec les VvGATs. Les échantillons sont injectés sous forte pression pendant 5s. La surface du capillaire est régénérée une fois par jour en injectant successivement de l'eau MQ (3 min), du méthanol pur, de l'hydroxyde de sodium 1 M (2 min), de l'hydroxyde de sodium 0.1 M (2 min), du chlorure d'hydrogène 0.1N (2 min) et enfin de l'eau MQ (2min). Le choix de l'étalon interne a été effectué en comparant les électrophérogrammes de 4 lots de solutions standards avec les différents substrats utilisés dans les réactions enzymatiques. 1 mM (concentration finale) de solutions d'UMP (uridine-5'-monophosphate), UTP (uridine-5'-triphosphate) et UDP-glucuronique (acide uridine-5'-diphosphoglucuronique) et d'acide benzoïque, préparés en utilisant du tampon Tris-HCl 100 mM à pH 8 ont ainsi été injectés sous les mêmes conditions d'électrophorèse. L'étalon interne a été choisi de façon à ce qu'il ne coélué pas avec les substrats et les produits de réaction ou les substrats.

La quantification des produits formés est effectuée en calculant le rapport de l'aire normalisée (AN) des produits formés sur l'aire normalisée AN de l'étalon interne.

## **5. PREPARATION DES EXTRAITS ENZYMATIQUES ET REACTIONS ENZYMATIQUES**

### **5.1. Etudes des glucosyltransférases**

#### ***5.1.1. Détermination du pH optimum, études des spécificités des substrats***

Pour chaque essai, le milieu réactionnel (volume final 200µl) était composé de :

- 20 µg/mL d'enzyme recombinante
- 2.5 mM d'UDP- Glucose ou d'UDP- Galactose en tant que donneur de sucre
- 1mM de substrats préparés en utilisant les tampons MES- HCl (100mM) pour les réactions à pH 4.5/5.5/6.5 et du Tris- HCl (100mM) pour celles effectuées à des pH 7.5 et 8.5. 0.1% (v/v) de β-mercaptoéthanol a été rajouté. Les substrats sont dissous dans 10 % (v/v) de méthanol avant ajustement du volume avec le tampon adéquat.

Les réactions enzymatiques ont été maintenues à 37°C dans un bain sec pendant 10 min puis elles sont arrêtées en ajoutant 54 µL de méthanol 100 % et 6 µL d'acide benzoïque à 60µl de la réaction. Le mélange est stocké à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Pour déterminer le pH optimal, des réactions enzymatiques à 5 pH différents (4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5) ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales. L'acide gallique a été utilisé comme substrat pour cette expérience.

Pour la spécificité des substrats, 11 substrats potentiels dont des dérivées benzoïques (C<sub>6</sub>C<sub>1</sub>): acide para-hydroxy benzoïque (4-HBA), acide protocatéchique (3,4-diHBA), acide gallique (3,4,5 triHBA), acide syringique (3,5-diM-4-HBA), des dérivés d'acide cinnamique (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>) : acide coumarique (4-HCA), acide caféique (3,4-diHCA), acide sinapique (3,5 diM-4-HCA)

ainsi que des stilbènes et des flavonoïdes : resvératrol, quercétine, cyanidine, catéchine, ont été testés à pH 6.5, 7.5 et 8.5 en présence de l'UDP-Glc comme donneur de sucre. Les réactions enzymatiques ont été réalisées dans les mêmes conditions de température et de temps.

Afin d'étudier les activités des glucosyltransférases en présence d'autres donneurs de sucre, des réactions enzymatiques ont été de même effectuées en utilisant l'UDP-galactose. Les réactions ont été effectuées à 3 pH (6.5, 7.5, et 8.5) dans les mêmes conditions de température et de temps de réaction en présence d'acide gallique et d'acide caféique.

### ***5.1.2. Etudes des paramètres cinétiques***

La détermination *in vitro* des paramètres cinétiques a été réalisée par incubation de concentrations croissantes de substrat (2  $\mu$ M jusqu'à 2 mM) d'acide gallique et d'acide caféique avec des concentrations fixes de protéines à 3 pH différents (6.5, 7.5, et 8.5) et sous les mêmes conditions de température et de durée de réaction que décrites précédemment.

### ***5.1.3. Etudes des activités des glucosyltransférases en présence d'ions***

L'influence des ions sur les activités enzymatiques à 3 pH a été étudiée. Les milieux réactionnels étaient formés de 1mM d'acide gallique, 1mM d'ions  $Fe^{2+}/Mn^{2+}/Cu^{2+}/Mg^{2+}/Zn^{2+}$ . Les réactions étaient maintenues sous les mêmes conditions de température et de durée.

## **5.2. Etude des glucose-acyltransférases**

Pour chaque essai, le milieu réactionnel (volume final 200 $\mu$ L) était composé de :

- extrait d'enzyme recombinante (substrat ou culot).
- 2.5 mM de  $\beta$ - glucogalline fourni par Gross (Molekulare Botanik, Universita Ulm, D-89069 Ulm, Germany) ou synthétisés par voie enzymatique ou le glucose-ester d'acide caféique synthétisés par voie enzymatique en tant que donneur d'acyl.
- 1 mM de substrats épicatechine, épigallocatechine ou tartrate de potassium préparés en utilisant les tampons phosphate 100 mM pour les réactions à pH 2.5/3.5/4.5/5.5. 0.1% (v/v) de  $\beta$ - mercaptoéthanol a été rajouté pour la préparation des tampons.

Les substrats sont d'abord dissous dans 10 % (v/v) de méthanol puis le volume est ajusté dans une fiole jaugée. Les réactions enzymatiques ont été maintenues à 37°C dans un bain sec pendant 1 h.

## **6. IMAGERIE**

Ces techniques ont été utilisées pour localiser les protéines dans des tissus végétaux. Ces expériences ont été menées sur la plateforme RIO Imaging avec l'aide des membres de l'équipe Biosynthèse des Polyphénols, équipe PI, UMR SPO.

### **6.1. Préparation des tissus végétaux**

Les hairy roots sont inclus dans de l'agarose à 3%. Des coupes transversales de 50 µm d'épaisseur sont réalisées au Vibratome (MICROM HM650V, Walldorf, Germany). Les coupes sont ensuite montées entre lames et lamelles en présence de milieu liquide pour éviter le dessèchement (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA).

### **6.2. Observations microscopiques**

Pour sélectionner les transformants racinaires exprimant les fusions à la GFP, nous avons eu recours à des observations à l'aide de la loupe binoculaire équipée de filtres d'excitation et d'émission adéquats pour la GFP (Loupe Olympus Fluorescente). La localisation de la protéine exprimée a été observée en microscopie confocale à balayage laser sur des coupe transformants racinaires en cours croissance.

Les observations ont été réalisées avec un microscope confocal de type LSM 510 META inversé Axioplan2 avec un objectif C-Apochromat 40x/1.20 water (Zeiss, Gottingen, Allemagne) à la plateforme Montpellier RIO Imaging (<http://www.mri.cnrs.fr>). Les observations confocales ont été faites en utilisant un laser Argon (488nm) et la lumière blanche. La détection de la fluorescence de la GFP émise se situe dans la bande passante 505-530 nm. Le microscope est piloté par le logiciel LSM 510 (Zeiss). Le diaphragme confocale (pinhole) est réglé à une unité d'Airy. Les images sont acquises de manière à optimiser le signal, en minimisant la saturation et le bruit de fond. Les réglages classiques pour la prise d'images s'effectuent en 12 bits avec une résolution de 512x512, un moyennage de 4 et un balayage à vitesse de 7.

## **CHAPITRE 3 : LES GLUCOSYLTRANSFERASES**

Les plantes ont la particularité de s'adapter rapidement à leur environnement externe pour maximiser les opportunités et minimiser les risques. Cette plasticité dépend de la croissance, du développement et du métabolisme, mais aussi de l'évolution des divers mécanismes pour réguler l'homéostasie cellulaire. En coordination avec l'hydroxylation, l'acylation et les réactions de méthylation, la glycosylation contribue à la diversité et la complexité des métabolites secondaires chez les végétaux. La glycosylation est souvent une des dernières étapes de la biosynthèse de composés naturels et de nombreuses études ont montré qu'elle constitue l'un des mécanismes indispensables pour convertir des aglycones réactifs ou toxiques en des formes plus stables. La glycosylation améliore leur solubilité, leur stabilité, leur réactivité et facilite leur stockage et leur accumulation dans les cellules végétales (Hosel, 1981, Jones et Vogt, 2001; Gachon *et al.*, 2005; Bowles *et al.*, 2005). L'importance de la glycosylation dans la stabilisation des métabolites secondaires a été particulièrement démontrée chez les glucosinolates et glucosides cyanogènes. Dans ces cas, la fixation du glucose est une exigence absolue pour la stabilité et empêche la dégradation spontanée vers les aldéhydes ou les isothiocyanates (Halkier et Gershenzon, 2006). Les flavonoïdes sont également rencontrés le plus souvent sous forme glycosylée (Harborne et Baxter, 1999; Frydman *et al.*, 2004; Osbourn, 2003 ; Richman *et al.*, 2005).

La glycosylation est catalysée par une famille d'enzymes connue sous le nom de glycosyltransferases. Les glycosyltransferases, catalysant le transfert de groupes glycosyles depuis un substrat donneur vers un substrat accepteur, constituent une superfamille d'enzymes avec plus de 92 familles décrites jusqu'à ce jour ([www.cazy.org / fam / acc\\_GT. html](http://www.cazy.org/fam/acc_GT.html)), en fonction de leur similarité de séquence, de la stéréochimie de la liaison glycosidique formée et de leur spécificité de substrats. Une de ces familles, la famille I, comprend les UDPG-glycosyltransferases (UGT) qui utilisent des UDP-sucre (uridine diphosphate-sucre) comme donneurs de sucre activé et contiennent le motif PSPG (Putative Secondary Plant Glucosyltransferases) dans leurs séquences d'acides aminés (Mackenzie *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2001 ; Ross *et al.*, 2001).

Un grand nombre de gènes UGT sont impliqués dans la glycosylation des produits végétaux naturels. Chez *Arabidopsis thaliana*, 120 gènes codant des protéines UGT ont été identifiés dans le génome (Paquette *et al.*, 2003). Plusieurs d'entre eux sont impliqués dans la glycosylation de composés phénoliques (Li *et al.*, 2001 ; Paquette *et al.*, 2003). Les UGT sont généralement spécifiques à la fois du donneur de sucre (et donc catalysent le transfert d'un sucre particulier) et du récepteur de sucre (nature de la molécule et position de glycosylation). Par exemple, les UGT78D1 et UGT73C6 d'*Arabidopsis* sont impliquées dans la biosynthèse des flavonols glucosides *in vivo*, la première catalysant le transfert de rhamnose de l'UDP-

rhamnose sur l'hydroxyle en 3 de la quercétine ou du kaempférol et la seconde celui d'un glucose de l'UDP-glucose sur l'hydroxyle en 7 de la quercétine-3-O-rhamnoside et du kaempférol-3-O-rhamnoside (Jones *et al.*, 2003). Dans une autre étude, il a été montré que l'UGT78D2 catalyse la glycosylation de la cyanidine et des flavonols en position 3 tandis que l'UGT75C1 a été caractérisée fonctionnellement comme étant une anthocyane 5-O-glycosyltransférase (Tohge, 2005). UGT72L1 issue de *Medicago truncatula* est impliquée dans la production d'épicatéchine 3'-O-glucoside, qui pourrait être un intermédiaire dans la biosynthèse des proanthocyanidines (Pang *et al.*, 2008).

Par ailleurs, d'autres glycosyltransférases ont été démontrées capables d'utiliser des acides hydroxycinnamiques tels que l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide cinnamique, voire les alcools coniférylique et sinapylique, et les aldéhydes, coniferaldéhyde et sinapaldéhyde en tant que substrats accepteurs de sucre (Lim *et al.*, 2001 ; Lim *et al.*, 2005). Dans le cas des acides phénoliques, la glycosylation peut impliquer le groupement carboxylique ou une fonction hydroxyle, les produits formés étant respectivement un glucose ester ou un O-glucoside. Les glucoses esters sont considérés comme des intermédiaires dans les voies de biosynthèse, permettant le transfert de l'aglycone vers un autre accepteur (Mock et Strack, 1993). La formation de sinapate-esters à partir de l'acide sinapique chez les *Brassicaceae* a été particulièrement étudiée (Lehfeldt *et al.*, 2000 ; ; Milkowski *et al.*, 2000a, 2000b ; Shirley *et al.*, 2001 ; Lim *et al.*, 2001 ; Milkowski *et al.*, 2004 ). Ainsi, il a été montré que le 1-O-sinapoylglucose (SG) était l'intermédiaire métabolique dans la synthèse de sinapoyl malate et sinapoyl-choline et les gènes codant pour des glycosyltransférases capables de catalyser la formation de glucose ester, en utilisant comme donneur l'UDP-glucose, ont été identifiés chez *A. thaliana* et chez *B. napus* (Milkowski *et al.*, 2000a, 2000b ; Lim *et al.*, 2001; Milkowski *et al.*, 2004).

En revanche, les O-glucosides représentant des formes stables de l'aglycone et sont souvent les formes transportées depuis le cytosol vers des compartiments cellulaires ou dans la plante (Hosel, 1981).

Dans plusieurs études, il a été démontré qu'une glycosyltransférase peut avoir la capacité de glycosyler plusieurs substrats (Bowles *et al.*, 2006). Un screening réalisé sur 90 protéines recombinantes de cette famille a permis d'en identifier 14 montrant une activité catalytique sur les acides benzoïques (Lim *et al.*, 2002). Certains de ces acides sont substrats de plusieurs de ces enzymes. Cependant l'étude a montré une forte régiosélectivité : quatre enzymes glycosylent la fonction carboxylique, l'une d'entre elle étant capable de glycosyler aussi l'hydroxyle en 2 de l'acide salicylique; les autres forment des O-glucosides avec une

spécificité pour l'hydroxyle en 2, 3, ou en 4, à l'exception de UGT73B4, qui peut glycosyler les positions 3 et 4.

Le génome de la vigne contient de l'ordre de 240 gènes UGT (The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization, 2007), et parmi celles-ci, trois ont été caractérisées fonctionnellement. On connaît l'UFGT (UDP-flavonoid glucosyltransferase) synthétisant la formation d'anthocyanidines 3-O-glucosides impliquées dans la coloration de la peau de raisin (Ford *et al.*, 1998), VvGT5, une UDP-glucuronic acid: flavonol-3-O-glucuronosyltransférase, et la bifonctionnelle VvGT6, une UDP-glucose/UDP-galactose:flavonol-3-O-glucosyltransferase/galactosyltransferase (Ono *et al.*, 2010).

Dans ce chapitre, nous proposons de caractériser 3 autres GTs de vigne, identifiées lors d'un criblage transcriptionnel après induction de la voie de biosynthèse des PAs. Ce travaux sont présentés sous forme d'article qui sera prochainement soumis.

---

## Identification and functional validation of new glucosyltransferases potentially involved in the biosynthesis of phenolic compounds

F. Khater, D. Fournand, S. Vialet, E. Meudec, V. Cheynier, N. Terrier  
*UMR1083 SPO, bât 28, INRA, 2, place P. Viala, F-34060 Montpellier, France.*

---

Grape proanthocyanidins (PA) contribute to plant defense mechanisms against biotic stress and also play a major role in organoleptic properties of wine. They are accumulated mainly in grape skin and seeds during the early stages of berry development. Despite the recent progress in identification of genes involved in PA biosynthesis, the mechanisms involved in subunit condensation, galloylation, or fine regulation of the spatio-temporal composition of PA in grape berries are still not elucidated.

Two Myb transcription factors VvMybPA1 and VvMybPA2 controlling the PA pathway have recently been identified and ectopically over-expressed in an homologous system. In addition to already known PA genes, three genes coding for glucosyltransferases were significantly differentially expressed between hairy roots over-expressing *VvMybPA1* or *VvMybPA2* and control lines. The involvement of these genes in PA biosynthesis metabolism is unclear.

The three glucosyltransferases display high sequence similarities with other plant glucosyltransferases able to catalyze the formation of glucose esters, which are important intermediate actors for the synthesis of different phenolic compounds. Studies of the *in vitro* properties of these 3 enzymes ( $K_m$ ,  $V_m$ , substrate specificity, pH sensitivity) were performed through production of recombinant proteins in *E. coli* and demonstrated that they are able to catalyze the formation of 1-O-acyl-Glc esters of phenolic acids but are not active on flavonoid and stilbene compounds. The transcripts are expressed in the early stages of grape berry development, mainly in the berry skins and seeds. The results presented here suggest that these enzymes could be involved *in vivo* in PA galloylation or in the synthesis of hydroxycinnamic esters.

---

## 1. INTRODUCTION

Phenolic compounds constitute one of the most numerous and ubiquitously distributed groups of plant secondary metabolites. Natural polyphenols can range from simple molecules (phenolic acids, stilbenes, anthocyanins ...) to highly polymerized compounds (lignins, tannins, etc.), with flavonoids representing the most common and widely distributed subgroup (Kaur *et al.*, 2001).

In grape, the most common phenolic acids include cinnamic and benzoic acids. Tartaric esters (i.e. caftaric (caffeoyltartaric), fertaric (feruloyltartaric), and coutaric acids (p-coumaroyltartaric)) of hydroxycinnamic acids (caffeic, ferulic, and p-coumaric acids respectively) are mainly found in fruits (Ribéreau-Gayon, 1965; Singleton *et al.*, 1978). Hydroxycinnamic esters are distributed in the flesh and skin of the berry and are important because of their involvement in browning reactions (Singleton, 1972; 1978), and because they are precursors of volatile phenols (Etiévant, 1981; Dubois, 1983; Chatonnet *et al.*, 1993). The hydroxycinnamic esters are accumulated during the initial period of growth, exhibiting a peak of accumulation prior to veraison, the onset of ripening (Romeyer *et al.*, 1983).

Flavonoids are widely distributed in plants, fulfilling many functions. Among them, proanthocyanidins (PAs) are polymers of flavan-3-ols involved in several physiological and biochemical processes in plants such as defense against herbivore (Beck and Schoonhoven, 1980; Coley *et al.*, 1985). In grape, they also play a critical role for wine quality as they contribute to its astringency and color stability.

Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ols, also called proanthocyanidins (PAs), are found in high concentrations in skins and seed tissues of grapevine (Kennedy *et al.*, 2001) and in a smaller amount in the pulp (Mané *et al.*, 2007). The seed and skin PA extension subunit compositions are quite different from each other. In seeds, PAs are based on (+)-catechin, (-)-epicatechin, and (-)-epicatechin 3-O-gallate, the gallic ester of (-)-epicatechin, with a polymerization degree below 10 (Prieur *et al.*, 1994), and galloylation rate around 10 to 20%. In skins, proanthocyanidins are mainly based on (+)-catechin (primarily as terminal subunit), (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin and (-)-epicatechin 3-O-gallate, along with trace amounts of (+)-gallocatechin, with a polymerization degree around 30 and galloylation rates below 5% (Souquet *et al.*, 1996).

PA accumulation in pericarp occurs immediately after fruit-set and maximum level of accumulation is reached around veraison (Kennedy *et al.*, 2001; Verriès *et al.*, 2008) whereas in seeds, PA accumulation occurs from fruit-set until 1-2 weeks after veraison (Kennedy *et al.*, 2001).

PAs, like other flavonoids, are derived from the phenylpropanoid pathway. Genetic and biochemical characterization of the flavonoid pathways in several plant species have led to the cloning and identification of a series of key structure and regulating genes (Shirley *et al.*, 1992; Winkel-Shirley, 2001). In *A. thaliana* seeds, PA biosynthesis was shown to be under the control of six genes encoding different types of regulatory proteins: TTG1 (WD40), TTG2 (WRKY), TT8 (bHLH), TT16 (MADS), TT1 (WIP) and TT2 (MYB) (Nesi *et al.*, 2000, Baudry *et al.*, 2004). The transcriptional complex TTG1-TT8-TT2 has been shown to be involved in activation of several structural genes of the PA pathway (Nesi *et al.*, 2000; Baudry *et al.*, 2004, Lepiniec *et al.*, 2006). In grapevine, two MYBs factors, VvMybPA1 and VvMybPA2, were recognized as regulators of the PA pathway, respectively in seeds and skins (Bogs *et al.*, 2007; Terrier *et al.*, 2009). The expression of these genes during berry development coincides with timing of PA accumulation. The ectopic over-expression of VvMybPA1 and VvMybPA2 in a hairy-root homologous system induced the accumulation of PAs (Terrier *et al.*, 2009).

To date, and in spite of this recent progress, several black boxes remain in this pathway: little is known about the mechanisms involved in either polymerization or galloylation of PA units or in their transport into the vacuole, their final storage site (Zhao *et al.*, 2010). In order to identify these missing actors, a transcriptomic analysis was performed on hairy-roots transformed with the two Myb factors known to regulate the PA pathway, VvMybPA1 and VvMybPA2 (Terrier *et al.*, 2009). Several of the significantly induced genes were already known to belong to the flavonoid pathway. Other genes have miscellaneous or even unknown function, and their role in link with PA biosynthesis is unclear. Among the most induced genes revealed by the transcriptomic screening, three glucosyltransferases (GT) were first chosen as candidate genes for further functional validation.

In literature, several types of glycosyl transferases have been demonstrated to be involved in phenylpropanoid metabolism. The grape gene encoding the enzyme UDPglucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) that catalyzes the O-glucosylation of anthocyanidins was obtained and the gene function was characterized (Ford *et al.*, 1998). Two other grape genes (VvGT5, VvGT6) involved in flavonol glycoside metabolism were characterized and catalyzed respectively the synthesis of flavonol 3-O-glucuronide and flavonol 3-O-glucoside/galactoside in grapevine (Ono *et al.*, 2010). In *Vitis labrusca*, Hall and DeLuca (2007) identified a bifunctional glucosyltransferase VIRSgt able to form glc-ester with phenolic acids in acidic conditions and O-glucosides with stilbene and flavonol in more basic conditions, at much lower rates.

Recently, a glucosyltransferase, UGT72L1 was shown to be induced in *Medicago truncatula* hairy roots over-expressing AtTT2 (Pang *et al.*, 2008). The protein encoded by this gene was

shown to be able to catalyze the formation of epicatechin 3'-O-glucoside (Pang *et al.*, 2008), which is not accumulated in plants but may serve as an intermediate in PA polymerization. GT activities toward metabolites of the general phenylpropanoid pathway have been also investigated in relation to sinapate-ester formation in the *Brassicaceae* family. Sinapoylmalate and sinapoylcholine are two of the major sinapate esters of *Arabidopsis* (Chapple *et al.* 1992). Sinapoylmalate is a UV protectant of foliar tissue (Landry *et al.*, 1995), and sinapoylcholine is synthesized during seed development and degraded during germination to provide sinapic acid and choline for the seedling (Strack, 1982). 1-O-sinapoylglucose (SG) is an intermediate in the synthesis of these two sinapate esters and genes encoding those glc-esters forming enzymes were isolated and further characterized in *Arabidopsis* and rapeseed (Milkowski *et al.*, 2000a and b, 2004; Lim *et al.*, 2001). The synthesis of methyl and ethyl esters of cinnamate, important strawberry flavor compounds, also involves cinnamoyl-Glc-ester as intermediate, whose formation is catalyzed by FaGT2, a glc-ester forming enzyme (Lunkenbein *et al.*, 2006).

This report describes the isolation and functional validation of three genes encoding glucosyltransferases from grapevine. Full-length cDNAs for the three *GTs* were amplified, cloned and fully sequenced and a phylogenetic analysis of these sequences was performed. The expression of the genes was studied during berry development and in different parts of the berry. The proteins were heterologously expressed and functionally characterized *in vitro*. Being able to form glc-ester with a wide range of phenolic acids and most particularly with gallic acid, they were called Vv galloyl Glucosyl Transferase (VvgGT). The glucose-ester formation and its role in PA and other phenolic metabolites biosynthesis will be discussed.

## **2. EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **2.1. Plant material and nucleic acid extraction**

Grape berries (*V. vinifera* L. cv. Syrah) was obtained at several developmental stages from plants grown in SupAgro-INRA vineyard (Montpellier- France) before and after the onset of fruit ripening (veraison) on the 11<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup>, 65<sup>th</sup>, 86<sup>th</sup> and 99<sup>th</sup> day after anthesis. At veraison (day 52) berries were separated into two batches: one batch containing green and hard berries and the other one containing soft but still green berries (just at the onset of ripening, before coloration). On stages 18<sup>th</sup> day, ripening (day 52) and 99<sup>th</sup> day, the skin, pulp and seed were separated.

After sampling, plant berries were immediately frozen in liquid nitrogen, then ground to a fine powder with a Dangoumau blender (Dangoumill 300, Lonjumeau, France) and stored at –

80°C until use. Total RNA was extracted using the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instruction, starting from 50 mg tissue.

## 2.2. Real-Time PCR

Total RNA isolated from berries was quantified using the Ribogreen reagent (Molecular probes, Leiden, Netherlands). 500 ng of total RNA was used for reverse transcription using superscript II RT kit in a total volume of 20 µL (Invitrogen, Fischer Bioblock, Illkirch, France). Gene expression was monitored in triplicate using 1µl of cDNA with the gene-specific primers called VvgGTiexp F and R, where i=1 to 3 and F and R correspond to Forward and Reverse primers, respectively (Table 5). The PCR (Polymerase Chain Reaction) was performed using a model 7300 sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK) and the Power SYBR-Green PCR Master- kit (Applied Biosystems, Applera France, Courtaboeuf, France). EF1alpha (GT181C12) was used as reference for normalization of gene expression (Terrier *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2006). The difference between the cycle threshold (Ct) of the target gene and EF1 alpha was used to obtain the normalized expression of the target gene, calculated as  $2^{-\text{exp}-(\text{Ct}_{\text{target}} - \text{Ct}_{\text{EF1alpha}})}$

**Table 5.** Gene - specific primers for amplification

Purpose	Primer name	Sequence 5'-3'	Forward or Reverse	Restriction site
Real-Time PCR	VvgGT1expF	TTGAAGGGACACGTGTGAAG	F	
	VvgGT1expR	GAAACAAACAGGTTGCGTGA	R	
	VvgGT2expF	ATTTTGATGTAGCGTGAAATAAG	F	
	VvgGT2expR	TGGGTGACAAAAGTAGGGAAA	R	
	VvgGT3expF	TGAGTATGGTGCTGGTTTGC	F	
	VvgGT3expR	ACGCTACATCGTGACTCCTG	R	
PGEX-4T2 cloning for fusion protein expression	VvgGT1pGEXstart	GGATCCATGGGATCTGAATCAAAGCTA	F	BamHI
	VvgGT1pGEXstop	GCGGCCGCTTAAATTTTGTGTTTGTAAATG	R	NotI
	VvgGT2pGEXstart	GGATCCATGGGGTCTGAATCAAAGCTAG	F	BamHI
	VvgGT2pGEXrev	CTTATTTACAGCTACATCAAAAT	R	
	VvgGT2pGEXstop	GCGGCCGCTCAAATTTTCTTTGACTTGCA	R	NotI
	VvgGT3pGEXstart	GGATCCATGGGTTCTGAATCAAAGCTAG	F	BamHI
	VvgGT3pGEXstop	GCGGCCGCTCAAATTTTGTGTTGACTGGCA	R	NotI

### 2.3. Cloning and Vectors

cDNA fragments corresponding to *VvgGT1* to 3 sequences were amplified from *V. vinifera* L. cv. *Maccabeu*, using high fidelity Taq polymerase (Advantage<sup>®</sup> – HF 2 PCR kit, Clontech, California, USA). For heterologous expression of the proteins, forward (VvgGT1-to-3-pGEXstart) and reverse (VvgGT1-to-3-pGEXstop) primers including start and stop codons, respectively, and adequate restriction sites (Table 5). To ensure specificity of the amplification for *VvgGT2* and 3, we performed a first round of amplification with specific reverse primers called VvgGT2pGEXrev and VvgGT3expR located in their divergent 3'NC region. After cloning into pGEMT-Easy (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and digestion with the adequate restriction enzymes, the resulting fragments were ligated into plasmid pGEX-4T2 digested with the same restriction enzymes (GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom).

All types of constructions were inserted into DH5 $\alpha$  *E. coli* competent cells for propagation. Transformants with the inserted sequences were identified by colony PCR using the same primers as for amplification and were verified by plasmid sequencing.

### 2.4. Sequences analysis

Full-length amino-acid sequences of glucosyltransferases from several species were retrieved from public databases. Multiple sequence alignment was performed with ClustalW2 alignment algorithm with default parameters (Thompson *et al.*, 1994). Phylogenetic analysis was performed from the clustalW alignment using the neighbor-joining method in the MEGA4 package (Kumar *et al.*, 2004).

### 2.5. Heterologous expression of the 3 VvgGTs

*Escherichia coli* BL21(DE3) (Stratagene, La Jolla, California, USA) cells containing the GT cDNA fused with the GST sequence in PGEX-4T2 vector were incubated overnight in LB (Luria- Bertani) medium with ampicillin 100 $\mu$ g/ml at 37°C. The next day, 3 ml of *E. coli* cells were inoculated into 120ml of YTA 2X containing ampicillin (100 $\mu$ g/ml) and incubated with shaking at 37°C until the DO<sub>600</sub> reached 0.8. 0.1mM final IPTG (isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside) was then added and the culture was incubated overnight (17 to 24 hours) at room temperature (24°C) to initiate the induction of GST- VvgGT1 to 3 fusion proteins. After 24h of induction, cells were pelleted by centrifugation at 4°C, 8000 g, and resuspended in 2 ml of ice cold PBS (phosphate buffer saline), 0.1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% (v/v) Triton X-100 and lysozyme (final concentration of 1mg/ml). Cells were disrupted by sonication and the lysate was centrifuged at 12 000g for 5 min. The supernatant was then

incubated with Glutathione– Sepharose™ 4B (GE Healthcare) for 30 min at room temperature with gentle mixing. The beads were washed several times with 1X PBS buffer (Phosphate buffered saline) and heterologous proteins were liberated from their GST-fusion part using thrombin. Bradford method (Bradford, 1976) was used to determine protein concentration with a bovine serum albumin calibration curve. The purified recombinant proteins were also analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on a 14% gel according to Laemmli's method (Laemmli, 1970) (results not shown). The purified recombinant protein stock was aliquoted and stored at -20°C with glycerol 10% (v/v) till their use for activity assays.

## 2.6. Enzyme assays

Reactions were carried out in an assay mix (200µl) containing a final concentration of 20µg/ml of recombinant protein, 2.5 mM UDP-Glc (Sigma-Aldrich) as sugar donor, and 1 mM (except for Km determination) of phenylpropanoid substrate prepared using adequate buffers. Reactions were performed at 30°C for 10 minutes at different pH values using acetate buffer (100 mM) for assays at pH 4.5, MES-HCl (100mM) for assays at pH 5.5/ 6.5 and Tris-HCl (100mM) for those at pH 7.5 and 8.5. All reactions contained 0.1% (v/v) β-mercaptoethanol. Reactions were stopped by mixing 60µl of the reaction medium with 54µl of 100% methanol and 6µl of benzoic acid (Sigma, Aldrich) used as internal standard and stored at -20°C prior to the electrophoresis analysis. Reactions without protein extract were systematically performed as controls. The specific enzyme activity was expressed in pmol of phenylpropanoid glucosylated per mg of protein and per second.

To determinate optimum pH, the activities of the 3 VvgGTs toward gallic acid were assayed at 5 pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5). For substrate specificity, initial screening for activity of the three proteins was performed against 11 potential substrates including benzoic acids (C<sub>6</sub>C<sub>1</sub>): PHBA (4-hydroxybenzoic acid, 4- HBA), protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid, 3,4-diHBA), gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid, 3,4,5 triHBA), syringic acid (2,3-dimethoxy,4-hydroxybenzoic acid, 3,5 diM-4-HBA), hydroxycinnamic acids (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>): p-coumaric acid (4-hydroxycinnamic acid, 4- HCA), caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid, 3,4- diHCA), sinapic acid (3,5-di methoxy, 4-hydroxycinnamic acid, 3,5 diM-4-HCA) a stilbene (trans-resveratrol), and flavonoids (quercetin , cyanidin, catechin). Reactions were carried out at pH 6.5, using identical assay conditions of temperature and reaction time. Quercetin , cyanidin, catechin and trans-resveratrol were purchased from Extrasynthèse (Genay, France). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

The kinetic parameters of the recombinant VvgGT enzymes were obtained from hyperbolic Michaelis – Menten saturation curves for acceptor substrates under optimal conditions. They

were measured over a range of 2 $\mu$ M -2 mM final concentrations of gallic acid and caffeic acid at 3 pH (6.5, 7.5, and 8.5) under identical assay conditions of temperature and reaction time. All assays were repeated in triplicate.

## **2.7. Identification of the VvgGTs products**

Products of the enzymatic reactions were identified by HPLC mass spectrometry analysis using a Waters Millennium HPLC-DAD system (Milford, MA) coupled with a Thermo Finnigan Advantage LCQ ion trap spectrometer fitted with an electrospray (ESI) interface (San Jose, USA).

Separations were performed by reversed phase HPLC on a (250  $\times$  2 mm i.d.) Atlantis dC18 column (Waters, Milford, MA; 5 $\mu$ m) with a guard column, operated at 30°C. Mobile phase consisted of water (eluent A) and water/acetonitrile (20/80, v/v/v) (eluent B). Flow rate was 0.25 mL/min. The elution program was as follows: starting with 0% B, linear gradients from 0 to 2% B (2-10 min), from 2 to 8% B (10-20 min), from 10 to 20% B (30-40 min), from 20 to 30% B (40-45 min), and from 30 to 40% B (45-50 min), followed by washing and reconditioning of the column.

Mass spectrometry experiments were conducted in the negative ion mode. The scan range was 100-2000 a.m.u. The desolvation temperature was 300°C, high spray voltage was set at 3000V, nitrogen was used as the dry gas at a flow of 5 and 35 units for the auxiliary and the sheat gas, respectively. An MS/MS analysis was performed with collision energy of 35%.

Alkaline hydrolysis was performed in 1N (final concentration) NaOH at room temperature for 1h and neutralized by 3M (final concentration) sodium acetate, pH5.2

## **2.8. Quantification and statistical analysis: Capillary electrophoresis analysis**

Enzymatic activity was assessed by measuring UDP by capillary electrophoresis (CE), performed using a Beckman PACE 5500 CE unit equipped with a diode assay detector. Beckman capillary tubing was for 75 cm x 75  $\mu$ m I.D x 375 $\mu$ m O.D. Samples were hydrodynamically injected for 5 s in the CE equipment using a laboratory- made programmable arm controlled by a micro- computer via an electronic interface. The running buffer used was a solution of 25 mM of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> at 8.5 (adjusted with NaOH). The applied voltage was 30 kV, the average current 40.1 $\mu$ A, the temperature 30°C and the selected wavelength at 214 nm. Capillary surface was regenerated once a day by consecutive washing with water (3 min), methanol, 1 M sodium hydroxide (2 min), 0.1 M sodium hydroxide (2 min) followed by 0.1N HCl (2 min) and water (2min). Calibration graphs were obtained by injecting standard solutions in the range of 0.1-1 $\mu$ g/ml. In all quantifications, benzoic acid

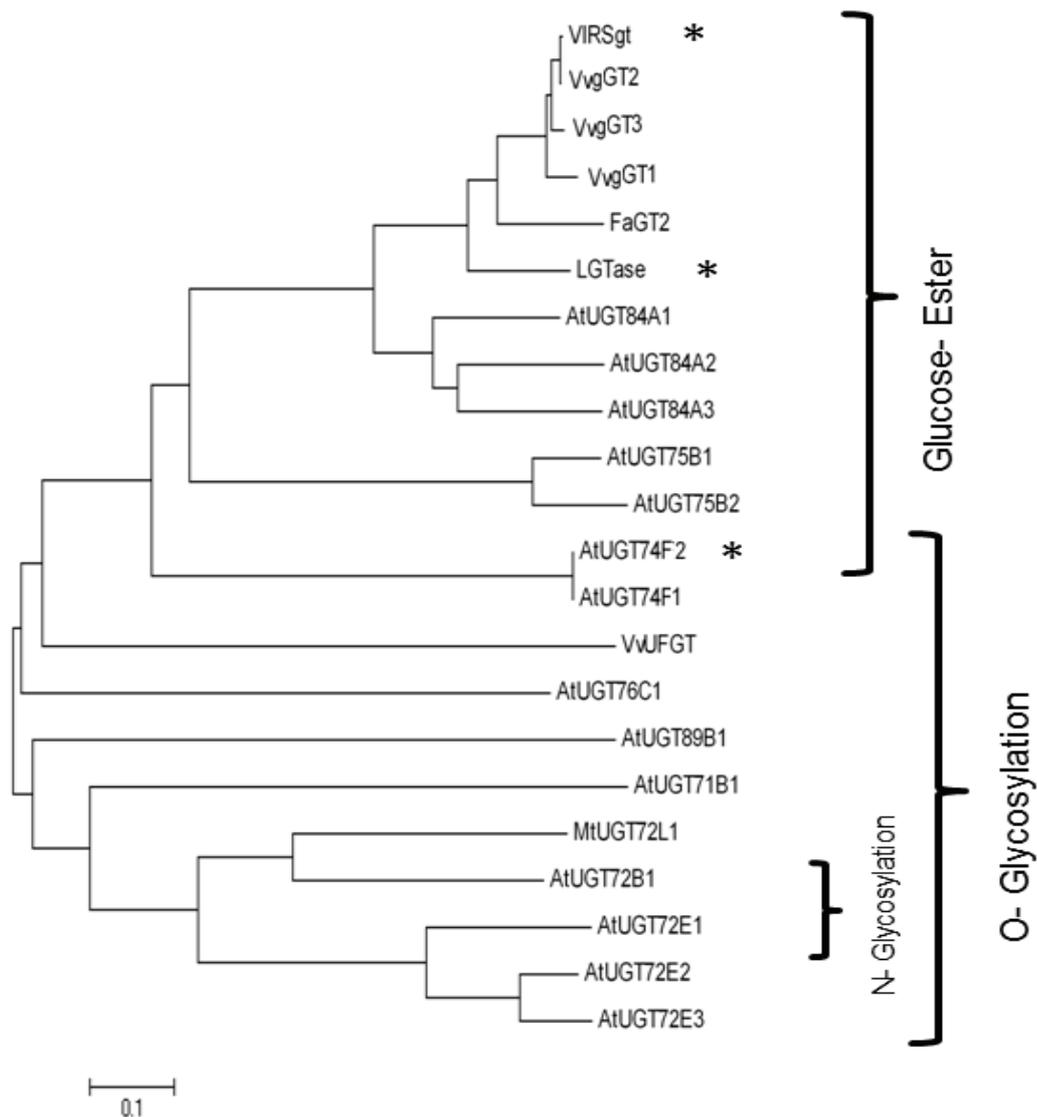
was used as internal standard (0.25mM final concentration) after the enzyme reaction had been stopped by the addition of methanol 100%. The eluting peaks were processed via the 32 Karat™ Software, version 5.0 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) and quantification was performed by evaluating the normalized area (NA) of UDP formed versus the internal standard area.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Identification of three putative glucosyltransferases

The full length *VvgGT1*, *VvgGT2* and *VvgGT3* cDNAs were amplified and the transcripts were 1437, 1437 and 1434 nucleotide long (Annexe1) , respectively coding for polypeptides of 479, 479 and 478 amino acid residues with a predicted molecular mass of 53.95 kDa , 53.79 kDa and 53.65 kDa . According to the 12 X version of the *Vitis vinifera* grape genome, the three genes are clustered on chromosome 3. *VvgGT1* corresponds to GSVIVT01037921001, located on position 6338114 to 6339547; *VvgGT2* corresponds to GSVIVT01003157001, located on position 6124678 to 6126114; *VvgGT3* corresponds to GSVIVT01003143001, located on position 6282074 to 6283510;

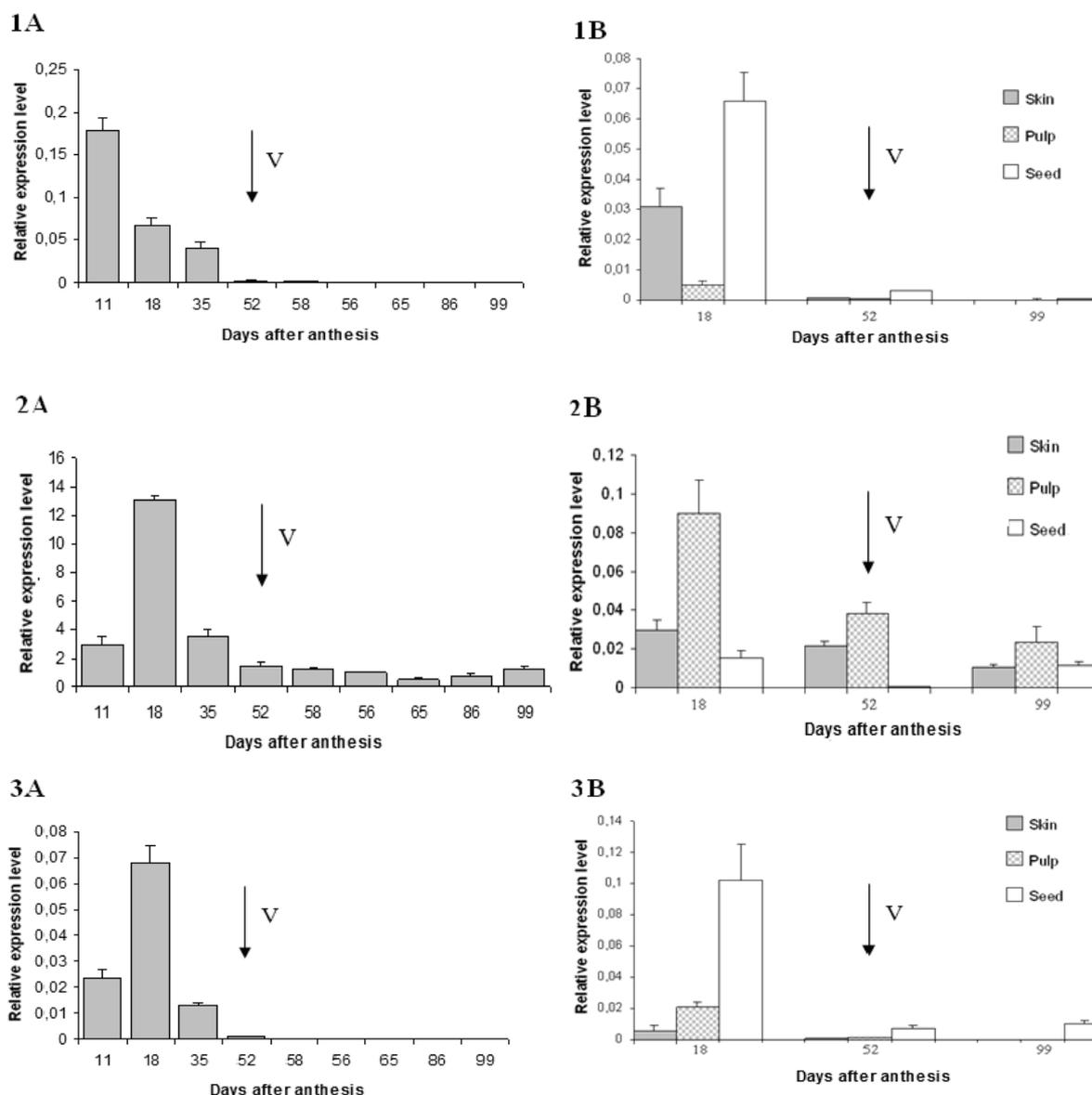
The 3 glucosyltransferases share more than 90% identity at the nucleotide level, a 92% amino acid identity and a similarity ranging between 97.5 and 98.7% to each other. Phylogenetic study was performed by comparing the three VvgGTs sequences to other plant sequences already identified as glucosyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism (Figure 24). High similarity in amino acid sequences were often observed when comparing our three VvgGTs to those clustered into the subgroup of glucosyltransferases encoding GTs able to catalyze the formation of glucose-esters. High divergences were observed by comparing our three VvgGTs to those forming O-glucosides from various substrates, including flavonoids.



**Figure 24.** Phylogenetic relationship of 3 *VvgGTs* cloned from *Vitis vinifera* with 19 other functionally characterized glucosyltransferases from several other plant species (*MtUGT72L1* (ACC38470) in Pang et al. (2008), *VIRSgt* (ABH03018) in Hall and De Luca (2007), *LGTase* (Q9MB73) in Kita et al. (2000), *FaGT2* (AAU09443) in Lunkenbein et al. (2006), *VvUFGT* (AAB81682) in Ford et al. (1998), *AtUGT84A1* (Z97339), *AtUGT75B2* (AC005106), *AtUGT75B1* (AC005106), *AtUGT74F1* (AC002333), *AtUGT74F2* (AC002333), *AtUGT78D2* (AL391141), *AtUGT71C1* (AC005496), *AtUGT71C4* (AC067971), *AtUGT71B1* (AB025634), *AtUGT72B1* (AC067971), *AtUGT73B3* (AL161584), *AtUGT73B4* (AC006248), *AtUGT89B1* (AC016662), *AtUGT89A2* (AL162751) in Lim et al. (2002), *AtUGT72E2* (AB018119), *AtUGT72E3* (AF077407), *AtUGT84A2* (AB019232) and *AtUGT84A3* (Z97339) in Lim et al. (2001), *AtUGT72E1* (AL049862) in Lim et al. (2005), *AtUGT76C1* (AB017060) in Hou et al. (2005)). The dendrogram was created using the neighbor-joining method in the MEGA4 package (Tamura et al.,2007). Lengths of lines indicate the relative distance between nodes.

### 3.2. Expression of *VvgGT1*, *VvgGT2* and *VvgGT3*

In order to study spatial and temporal expression pattern of the three *VvgGT* genes, a quantitative real-time PCR approach was performed all along berry development in the pericarp and in the different parts of the berries (skin, pulp and seeds) at three development stages (middle of green stage, véraison and ripe stage). At the developmental level, the three *VvgGTs* were strongly expressed at the beginning of green stage and their expression decreased thereafter till reaching very low values after véraison (Fig 25, 1A, 2A, 3A).



**Figure 25.** Quantitative real time PCR expression, normalized with the expression of *EF1 $\alpha$* , of *VvgGT1* (1), *VvgGT2* (2), *VvgGT3* (3) during berry pericarp development (1A, 2A, 3A) and at three development stages in different grape berry tissues (1B, 2B, 3B). Véraison (V) is marked with arrows. All data are means of three replicates, with error bar indicating SD.

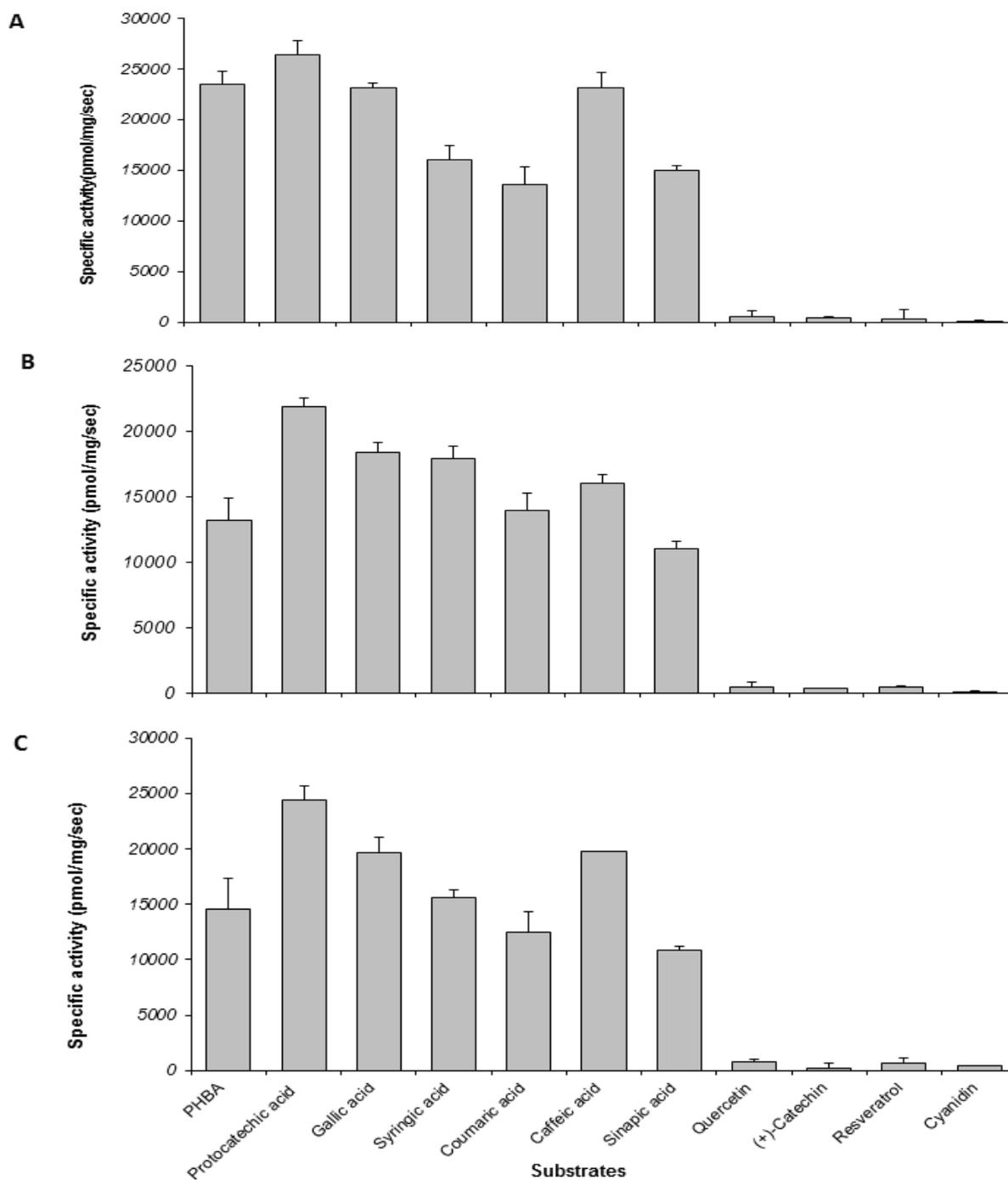
Figure 25 (1B, 2B, 3B) shows that the expression of the three genes is divergent among the different parts of the berry. *VvgGT1* is expressed in green tissues in both skin and seeds, *VvgGT3* expression is almost seed specific, while *VvgGT2* is predominantly expressed in the pulp.

### 3.3. Enzymatic activity of the recombinant enzymes

The three recombinant proteins were generated in *Escherichia coli* cells as GST fusion proteins. Purification was followed by using Glutathione Sepharose as an affinity matrix and then the GST portion of the recombinant fusion protein was cleaved by digestion with thrombin. The 3 purified VvgGTs were screened for glucosyltransferase activity.

To characterize the substrate specificity, the 3 VvgGTs were analyzed for activity against seven phenolic derivatives of hydroxybenzoic ( $C_6C_1$ ) and hydroxycinnamic ( $C_6C_3$ ) acids differing by the kind of aromatic substitution (hydroxy, dihydroxy, trihydroxy, hydroxydimethoxy) (Figure 26, Figure 28) and some flavonoids (quercetin, catechin, cyanidin) and stilbene (resveratrol). While most of Glc conjugates are found in the vacuole, glycosylation usually takes place in the cytosol (Vogt and Jones, 2000, Felle, 2005; Schulte *et al.*, 2006). The assays were thus performed at pH 6.5 to be closer to cytoplasmic condition in presence of UDP-Glc as sugar donor.

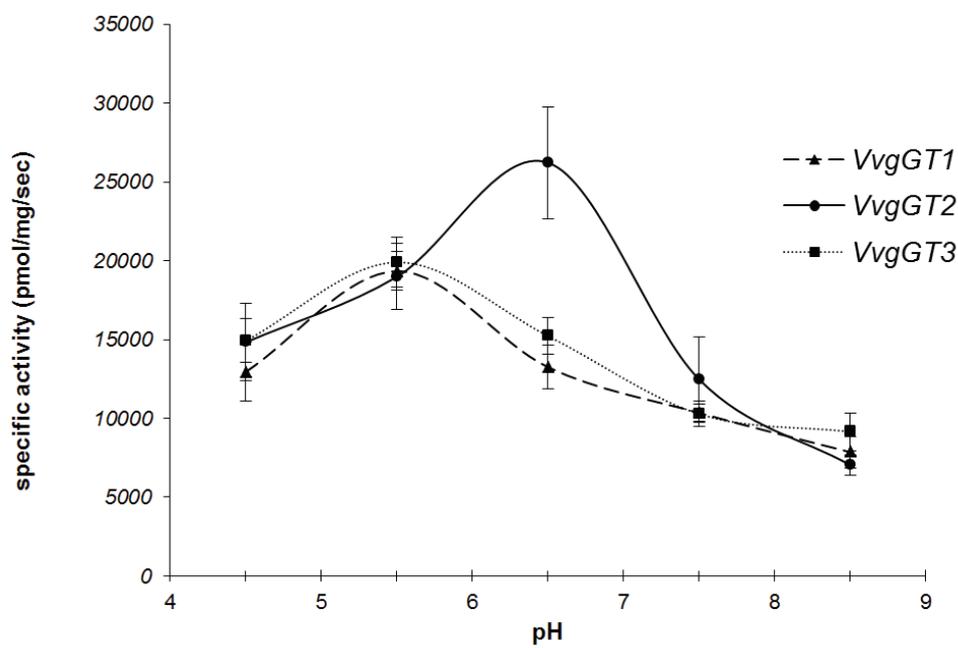
CE analysis of the reaction media showed that, among the 11 substrates tested, all phenolic acids were accepted as potential substrates by the three recombinant enzymes, UDP and an additional formed product being detected in the electrophoresis (Figure 26). On the other hand, no significant activity was detected toward stilbene and flavonoid substrates. VvgGT1 and VvgGT3 exhibited higher activity for hydroxybenzoic acids than for hydroxycinnamic acids, whereas this difference was less marked for VvgGT2. For both  $C_6C_1$  and  $C_6C_3$  substrates, the best activity was obtained with dihydroxy substituted phenol rings (Figure 26A, 26B, 26C).



**Figure 26.** Substrates specificity of the 3 recombinant VvgGTs tested *in vitro* at pH 6.5. A) VvgGT1. B) VvgGT2. C) VvgGT3. Each bar represents the mean of three assays  $\pm$  standard deviation.

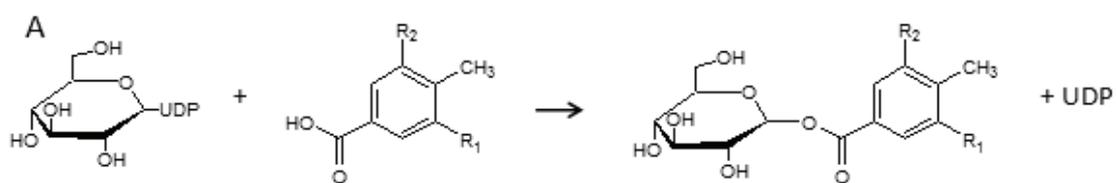
To further define optimal pH, recombinant VvgGT activities were assayed toward gallic acid between pH 4.5 and 8.5, by evaluating the UDP released by capillary electrophoresis.

The recombinant enzymes were active over a broad pH range. The maximal glucosyltransferase activity was observed between 5.5 (for VvgGT1 and VvgGT3) and 6.5 (for VvgGT2) and this activity decreased at higher pH (Figure 27).

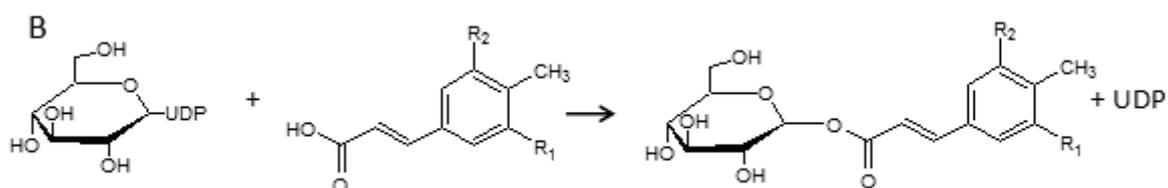


**Figure 27.** Effect of pH on in vitro activity of the three VvgGTs with gallic acid as substrate. Each point represents the mean of three assays  $\pm$  standard deviation. Reaction product is mostly produced between pH 5.5 and 6.5.

The products formed from the 11 substrates in presence of the 3 VvgGTs were analyzed by HPLC-DAD-ESI-IT-MS and compared with authentic standards (Table 6). Figure 29 and 30 present the results obtained for p-hydroxybenzoic and caffeic acids as substrates for VvgGT3. Identical results were obtained with the two other enzymes (results not shown). We confirmed that the three VvgGTs catalyzed the formation of glucose conjugates as described in Figure 29, eluting earlier than the corresponding aglycone, as expected from their relative polarities, and showing an excess of 162 a.m.u compared to the m/z signal of the acid. Fragmentation patterns were characteristic of the glucose-ester: loss of the glucose ( $-162$  and  $-180$ ), loss of the glucose and carboxylic group ( $-162-44$ ) and cleavage of the glucoside ( $660$  and  $-120$ ), and similar to these observed by Lunkenbein *et al.* (2006). No glucosylated molecule was detected when flavonoids or stilbene were used as substrates even at higher pH in contrast of results shown in Hall and DeLuca (2007).



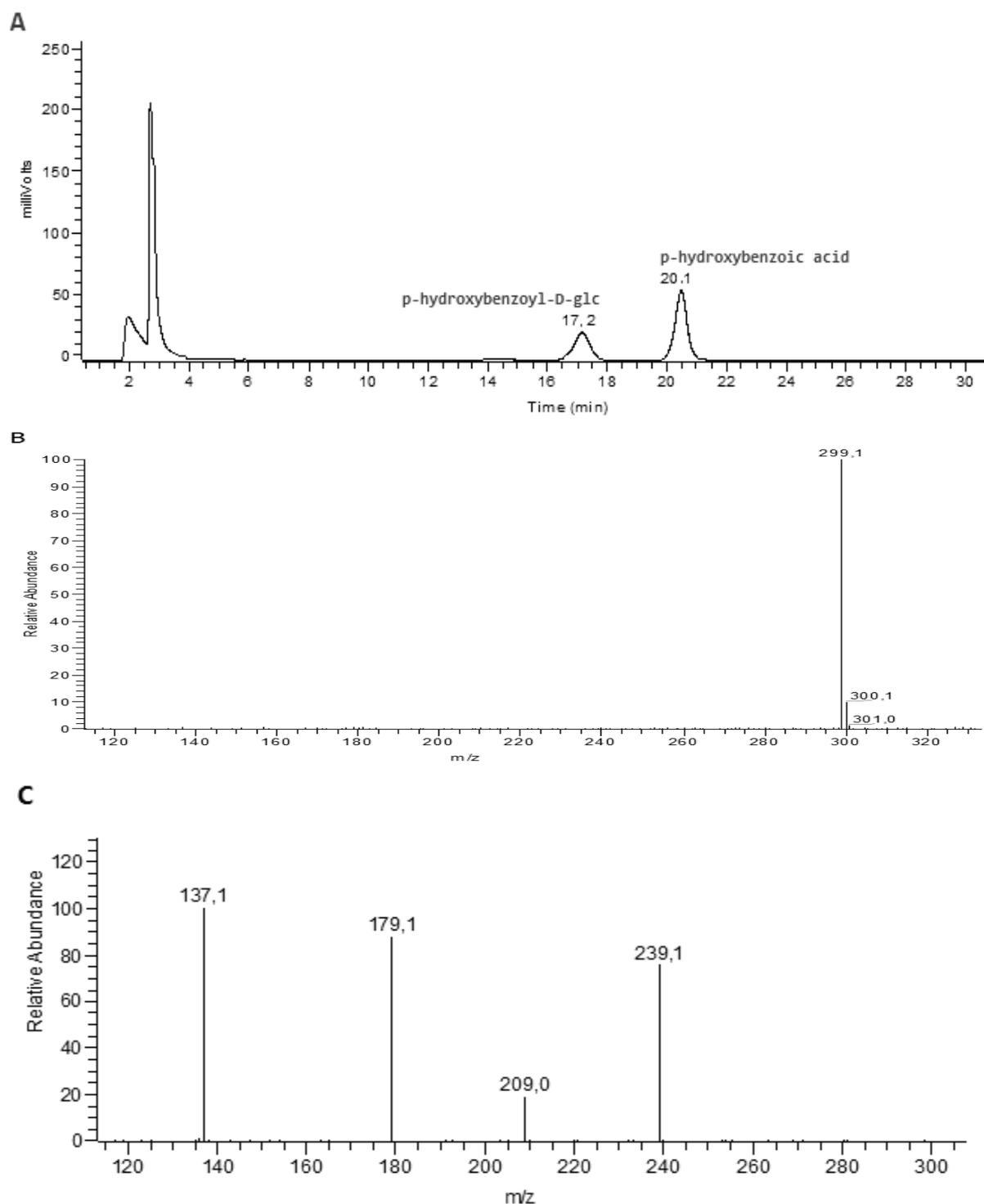
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (4-HBA)	H	H
protocatechuic acid (3,4-diHBA)	OH	H
syngic acid (3,5-diM-4-HBA)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
gallic acid (3,4,5-triHBA)	OH	OH



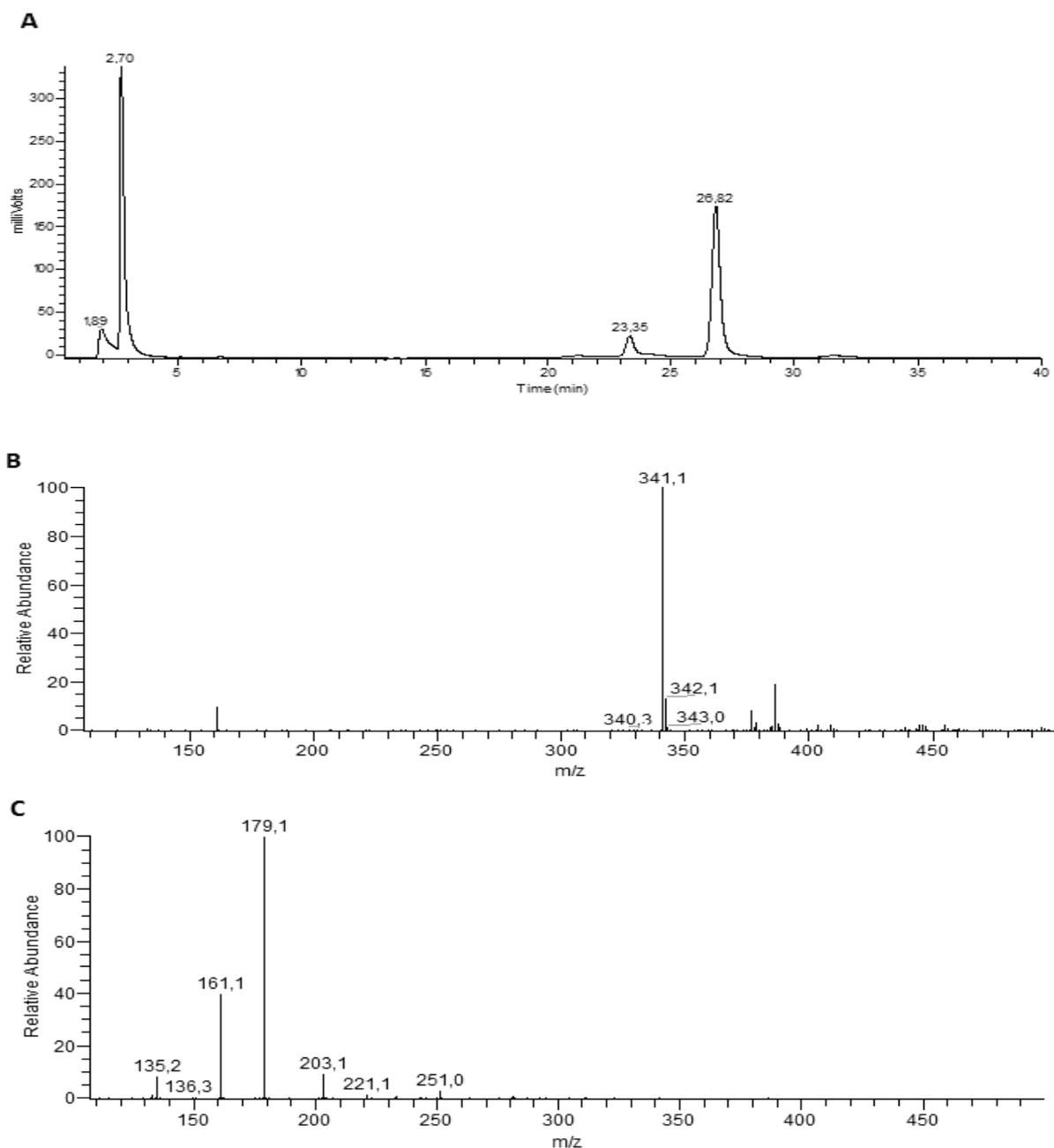
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<i>p</i> -coumaric acid (4-HCA)	H	H
caffeic acid (3,4-diHCA)	OH	H
sinapic acid (3,5-diM-4-HCA)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Figure 28** Chemical structures of some substrates and products of *VvgGTs*.

*VvgGT* converts (A) hydroxybenzoic acids, (B) hydroxycinnamic acids to the corresponding *Glc* esters, using UDP-activated *Glc*.



**Figure 29.** Characterization of the VvgGT protein product (*p*-hydroxybenzoyl- glucose)  
 (A) Chromatogram at 280nm of the reaction medium after 10 min of incubation at pH 6.5 of VvgGT3 with UDP-Glc and *p*- hydroxybenzoic acid. Mass spectrum (B) and MS2 spectrum (C) of *p*-hydroxybenzoyl- glucose (Rt= 17.2 min). Molecular ion [M-H]<sup>-</sup> at m/z= 299, and major fragments corresponding to the aglycone (-162 ; m/z=137) and to degradation of the glucose group (-60: m/z= 239 ; -120: m/z= 179) .



**Figure 30.** Characterization of the VvgGT protein product (caffeoyl-glucose)

(A) Chromatogram at 280nm of the reaction medium after 10 min of incubation at pH 6.5 of VvgGT3 with UDP-Glc and caffeic acid. Mass spectrum (B) and MS2 spectrum (C) of caffeoyl-glucose ( $R_t = 23.3$  min). Molecular ion  $[M-H]^-$  at  $m/z = 341$ , and major fragments corresponding to the aglycone ( $-162$ ;  $m/z = 179$ ) aglycone -  $H_2O$  ( $-180$ ;  $m/z = 161$ ) aglycone - carboxylic group ( $-206$ ;  $m/z = 135$ )

**Table 6.** Retention times and molecular ion and fragment ions of Glc esters formed by VvgGT3 and the corresponding phenolic acids.

Compound	Retention time (min)	MS [M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup> [M-H] <sup>-</sup>
<i>galloyl-D-glc</i>	7.4	331	271-211-169-125
<i>protocatechoyl-D-glc</i>	11.7	315	255-195-153-109
<i>p-hydroxybenzoyl-D-glc</i>	17.2	299	239-209-179-137
<i>caffeoyl-D-glc</i>	23.3	341	203-179-161-135
<i>syringoyl-D-Glc</i>	24.1	359	299-289-239-211-197-153
<i>p-coumaroyl-D-Glc</i>	26.5	325	145-163-187
<i>sinapoyl-D-glc</i>	30.0	385	247-223-205
<i>gallic acid</i>	7.6	169	125
<i>protocatechuic acid</i>	13.2	153	109
<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	20.1	137	93
<i>caffeic acid</i>	26.8	179	135
<i>syringic acid</i>	27.0	197	182-153-169-138
<i>p-coumaric acid</i>	31.9	163	119
<i>sinapic acid</i>	36.5	223	208-179-164

Treatment of reaction products formed with NaOH (to final concentration of 1N of NaOH) converted them back into the aglycone indicating that the glucose-ester of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids have been produced and thus demonstrating the ability of the three VvgGTs to glycosylate hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids on their carboxyl group.

The control, using the GST alone produced by *E. coli* carrying the empty plasmid as enzymatic extract, was unable to glucosylate any of the phenylpropanoids (results not shown).

### 3.4. Kinetic parameter of the three recombinant proteins

The kinetic parameters of the three VvgGTs were examined using two potential *in vivo* substrates as suggested by *in vitro* substrate specificity studies and grape phenolic composition. Kinetic and affinity assays were thus performed toward gallic acid and caffeic acid, respectively representative of the benzoic and hydroxycinnamic acid series as acceptor substrates and UDP-Glc as donor substrate. The reaction was maintained at 30°C for 10 minutes and carried out with 2.5 mM UDP-Glc and varying concentrations of gallic or caffeic acid at three pH values (6.5, 7.5 and 8.5). Kinetic parameters were obtained using hyperbolic Michaelis and Menten saturation curves.

As shown in Table 7, the resulting plots for the two substrates yielded  $K_m$  value between 161 and 215  $\mu\text{M}$  for caffeic acid, while with gallic acid  $K_m$  values varied between 310 and 434  $\mu\text{M}$ . These results suggest that VvgGTs exhibit higher affinity for caffeic acid ( $\text{C}_6\text{C}_3$ ) compared to gallic acid ( $\text{C}_6\text{C}_1$ ).  $K_m$  values decreased slightly when pH increased for both substrates and for the three enzymes except for caffeic acid at pH 8.5 in presence of VvgGT3. Affinity of the three enzymes for each of the tested substrates was of similar magnitude. For the 3 VvgGTs and for both substrates, maximal reaction rates decreased when pH increased except in one case. The highest maximum reaction rates were obtained when the reactions were performed at pH 6.5, except for the reaction in presence of caffeic acid and VvgGT2, where pH 8.5 led to a maximal  $V_m$  equal to 5.290  $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Reaction rates were higher when the three VvgGTs were in presence of gallic acid rather than caffeic acid, for the 3 pH values, except for VvgGT2 at pH 8.5.

**Table 7.** Michaelis - Menten Kinetics ( $K_m$ ,  $V_m$  values and catalytic efficiency  $K_{cat}/K_m$ ) of the three recombinant VvgGTs toward gallic acid (1A), and caffeic acid (1B) at 3 pH (6.5/ 7.5/ 8.5)

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\text{nkat mg}^{-1}$ )	$K_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ )
<b>1A Gallic acid</b>				
<b>VvgGT1</b>				
pH=6.5	510 $\pm$ 32	40.1 $\pm$ 5.3	2.16 $\pm$ 0.28	4231
pH=7.5	220 $\pm$ 59	27.7 $\pm$ 1.9	1.49 $\pm$ 0.10	6772
pH=8.5	221 $\pm$ 49	17.4 $\pm$ 1.6	0.934 $\pm$ 0.08	7124
<b>VvgGT2</b>				
pH=6.5	884 $\pm$ 188	52.3 $\pm$ 4.5	2.8 $\pm$ 0.24	3166
pH=7.5	307 $\pm$ 117	31.5 $\pm$ 3.4	1.7 $\pm$ 0.18	5521
pH=8.5	227 $\pm$ 56	9.3 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.03	2197
<b>VvgGT3</b>				
pH=6.5	566 $\pm$ 190	40.6 $\pm$ 1.7	2.19 $\pm$ 0.09	3871
pH=7.5	352 $\pm$ 145	29.4 $\pm$ 3.6	1.58 $\pm$ 0.19	4486
pH=8.5	35 $\pm$ 16	2.9 $\pm$ 0.3	0.15 $\pm$ 0.01	4237

## 1B Caffeic acid

	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ (nkat $mg^{-1}$ )	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} M^{-1}$ )
<b>VvgGT1</b>				
pH=6.5	165 $\pm$ 67	21.6 $\pm$ 2.2	1.16 $\pm$ 0.12	7021
pH=7.5	133 $\pm$ 32	18.1 $\pm$ 1.0	0.97 $\pm$ 0.56	7284
pH=8.5	29 $\pm$ 20	9.5 $\pm$ 1.4	0.51 $\pm$ 0.07	17617
<b>VvgGT2</b>				
pH=6.5	105 $\pm$ 30	27.5 $\pm$ 1.8	1.48 $\pm$ 0.1	14162
pH=7.5	129 $\pm$ 36	21.4 $\pm$ 1.4	1.15 $\pm$ 0.07	8984
pH=8.5	44 $\pm$ 17	5.9 $\pm$ 0.4	0.31 $\pm$ 0.22	6949
<b>VvgGT3</b>				
pH=6.5	142 $\pm$ 57	19.9 $\pm$ 1.9	1.07 $\pm$ 0.1	7519
pH=7.5	132 $\pm$ 55	18.4 $\pm$ 1.8	0.99 $\pm$ 0.09	7477
pH=8.5	18 $\pm$ 14	1.9 $\pm$ 1.7	0.1 $\pm$ 0.08	5586

The catalytic efficiency ( $K_{cat} K_m^{-1}$ ) values for the two substrates suggested that gallic acid is the best substrate for VvgGT1 and VvgGT3 whatever the pH. For VvgGT2, caffeic acid is the best substrate. By comparing  $K_{cat} K_m^{-1}$  in terms of pH, VvgGTs were more efficient at acidic pH values except for VvgGT2 with caffeic acid as substrate.

The kinetic properties of the 3 VvgGTs with both caffeic and gallic acid as acceptor substrates at 3 pH were comparable to the properties of previously characterized glucose ester-forming enzymes from *Fragaria ananassa* and *Vitis labrusca* (Lunkenbein *et al.*, 2006, Hall et De Luca, 2007).

## 4. DISCUSSION

### 4.1. VvgGTs are glucose-ester forming enzymes

In plant secondary metabolism, glycosylation is a frequent chemical modification involved in intermediate or terminal metabolic steps of natural product biosynthesis (including transport, detoxification processes) and contributes to the diversity of these compounds (Vogt and Jones, 2000). Single or multiple glycosylation of the acceptors can occur at  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-SH$  and  $-CH$  groups. These reactions, respectively leading to the production of glucosides and O-, N-, S- and C- glycosides, have been extensively reviewed (Bowles *et al.*, 2005; Ikan, 1999; Jones et Vogt, 2001; Lim *et al.*, 2002; Pflugmacher and Sandermann, 1998; Vogt and Jones, 2000).

The sequences of the 3 VvgGTs are most closely related to ester-forming GTs from arabidopsis (Milkowski *et al.*, 2000a, Sato *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2001) and from rapeseed (Milkowski *et al.*, 2000b) as well as FaGT2 from strawberry (Lunkenbein *et al.*, 2006) and the VLRSgt identified by Hall and De Luca (2007) showing a bi-functional activity toward resveratrol to form O-glucoside at elevated pH and hydroxycinnamic acids to form glc-esters in more acidic conditions. Interestingly, the sequences are located within the same branch in the phylogenetical tree, and separately from the GTs involved in the O-glucosylation of anthocyanins (Harborne and Williams, 2000) or the formation of epicatechin 3'-O-glucoside (Pang *et al.*, 2008). Noticeable divergence was also measured with several multifunctional glucosyltransferases catalyzing the formation of O-, N- or C- glucoside such as the arabidopsis UGT72B1 (Bazier-Hicks *et al.* 2007) and UGT72 E1 involved in N- and O- glucosylation (Lim *et al.*, 2002), UGT72E2 and UGT72E3 characterized as O-sinapoyl glucosyltransferases (Lim *et al.*, 2001) and UGT71B1 involved in formation of O- glucosylation in the 2- OH position of benzoate substrates and UGT74F1 highly specific for O-glucoside formation (Lim *et al.*, 2002).

However, sequence homology is far from being a definitive argument to describe the precise enzymatic activity of the VvgGTs, as illustrated by *A. thaliana* UGT74F1 and UGT74F2 exhibiting 82% of identity but catalyzing respectively formation of ether and ester glucosides with salicylic acid as substrate (Lim *et al.*, 2002). Some glucosyltransferases can be involved in both O-glucoside and ester-glucose formation, consistent with bi- functional role in substrate modification and depending on the reaction condition or not (Hall and De Luca, 2007; John *et al.*, 2008). The 3 VvgGTs are assigned to the same group in the phylogenetic tree as *Satsuma mandarina* known to produce limonoid O-glycosides (Kita *et al.*, 2000). This knowledge emphasizes the necessity of complementary assays for characterization of the 3 GTs enzymes.

Substrate specificity studies with the 3 VvgGTs showed that they can recognize multiple substrates and that all hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids could be used as potential substrates. The three VvgGTs exhibited a strict regio-specificity for the acceptor site as described in Vogt and Jones (2000), being able to glycosylate substrates by attaching the glucose to their carboxyl group.

VvgGT1 and VvgGT3 showed a higher catalytic efficiency for a C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> acid like gallic acid than with caffeic acid and therefore their substrate specificity is similar to those of glucosyltransferases involved in the formation of glucose esters of hydroxybenzoic acids in *Fagaceae*, *Pinaceae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Lamiaceae* species (Gross, 1983, Klick and Herrmann, 1988). On the other hand, VvgGT2 displayed slight preference for

hydroxycinnamic acid derivatives, proposing similarity in function with other glucosyltransferases described in Lee et Raskin (1999), Milkowski *et al.* (2000a), Lim *et al.* (2001), Lunkenbein *et al.* (2006), Kita *et al.* (2000). The 3 VvgGTs showed no glycosyl-transfer activity toward compounds containing no carboxylic group even at elevated pH. These results are in contrast to those presented by Hall and De Luca (2007) concerning both flavonoid and trans-resveratrol glycosylation activity, despite high homology between protein sequences (99% of identity between VvgGT2 and VLRSgt). However, in the earlier study (Hall and DeLuca, 2007), the catalytic properties of heterologously produced VLRSgt were studied without detaching the enzyme from its GST tag, and the enzymatic products were not analyzed by mass spectrometry.

The optimal pH of the 3 VvgGTs (pH 5.5-6.5) is consistent with results obtained for other glucose ester-forming enzymes, showing maximum activity around pH 6 (Lim *et al.*, 2002; Milkowski *et al.*, 2000a, b; Hall and DeLuca, 2007), which is lower than the optimal pH of enzymes forming O-glucosides with phenolic acids (Lim *et al.*, 2003).

#### **4.2. The VvgGTs could be involved in the production of hydroxycinnamic esters and PA galloylation using glc-esters as intermediate**

The *in vivo* role of glc-ester of phenolic acids and therefore of the enzyme catalyzing their formation remains to be established. Glucosides of gallic acid were detected in grape pomace but identified as O-glucosides by NMR (Lu and Foo, 1999). Glc-ester of coumaric acid were detected in the ripe berries of *Vitis labrusca* in traces amount (Hall and DeLuca, 2007), like more generally those of phenolic acids in the pericarp of *Vitis vinifera* berries (Monagas *et al.*, 2005). Moreover, transgenic hairy-roots where these VvgGTs are induced are not affected for glucosylated final end products (Terrier *et al.*, 2009). It can therefore be assumed that the enzymes characterized in this work catalyze the formation of glucose esters involved as intermediates in the phenylpropanoid pathway

Glucose has often been described as a recognizable “tag” for membrane transporter. In arabidopsis, p-AminoBenzoate (pABA) is synthesized in chloroplast and then transported and accumulated into vacuole in its glc-ester form (Eudes *et al.*, 2008). The predominant forms of salicylic acid in tobacco leaves are its O-glucosides, stored in the vacuole and it has been shown that the vacuolar uptake of the glucosylated molecule involves a H<sup>+</sup>-antiport mechanism (Dean et Delaney, 2005).

Transport experiments demonstrated that MATE1 or TT12, MATE-type transporters from medicago and arabidopsis respectively, mediate epicatechin 3'-O-glucoside transport (Zhao

and Dixon, 2009), while neither catechin nor epicatechin are transported by these proteins (Marinova *et al.*, 2007; Zhao and Dixon, 2009). Epicatechin 3'-O-glucoside was detected as a transient component of *Medicago* seed during PA accumulation (Pang *et al.*, 2008) and significant amounts of this molecule were encountered in immature seeds of *tt12* mutant, suggesting that the glucosylated form of epicatechin would be an intermediate metabolite, substrate of the MATE transporters (Kitamura *et al.*, 2010).

Despite not yet localized, it is possible that VvgGTs are cytoplasmic enzymes, like as demonstrated for other glucosyltransferases (Werner and Matile, 1985; Martinoia *et al.*, 2000; Jones and Vogt, 2001) even though the glucose conjugate products are stored in the vacuole (Oba *et al.*, 1981; Rataboul *et al.*, 1985; Werner and Matile, 1985; Yazaki *et al.*, 1995; Taguchi *et al.*, 2000). Glc-ester formation in grape cells would appear as a first modification step, allowing the transport of these molecules in intracellular organelles for further metabolic events.

On the other hand, evidences are growing in the litterature that glc-ester of phenolic acids can act as acyl donor in transesterification reactions. In Brassicaceae, 1-O-sinapoyl- $\beta$ -glucose serves as an acyl donor for the formation of sinapoylcholine, sinapoylmalate, and disinapoylglucose (Strack, 1986; Lehfeldt *et al.*, 2000; Shirley and Chapple, 2003). Li and Steffens (2000) have also characterized an 1-O- $\beta$ -acylglucose-dependent acyltransferase functioning in glucose polyester biosynthesis in *Lycopersicon pennelli*. More recently, the synthesis of avenacin A-1 in oats, an acylated plant defense compound, has been demonstrated to arise from transacylation between des-acyl avenacin A and N-methyl anthraniloyl-O-glucose, a glucose ester (Mugford *et al.*, 2009). Glc-esters would serve as activated intermediates in biosynthesis of other secondary metabolites, as described for the synthesis of chlorogenic acid and its derivatives in sweet potato (Villegas and Kojima, 1986) or gallotannins in oak (Gross, 1983). However, in both cases, gene identification is still lacking.

In the case of grape, the three *VvgGTs* are induced by the over expression of *VvMybPA1* et *VvMybPA2* recognized as specific regulators of the PA pathway respectively in seeds and skins (Bogs *et al.*, 2007; Terrier *et al.*, 2009). Moreover, the three genes are expressed predominantly in the early development stages before veraison, in parallel with PA accumulation (Kennedy *et al.*, 2001; Verriès *et al.*, 2008). Furthermore, whereas the *VvgGT1* and *VvgGT3* expression are restricted to seeds and to a lesser extent in skins in accordance with an implication in the galloylated PA biosynthesis, *VvgGT2* are mainly expressed in pulp, which would fit with an involvement in the hydroxycinnamate pathway. This putative involvement in those pathways is also in accordance with substrate preferences of *VvgGT1*

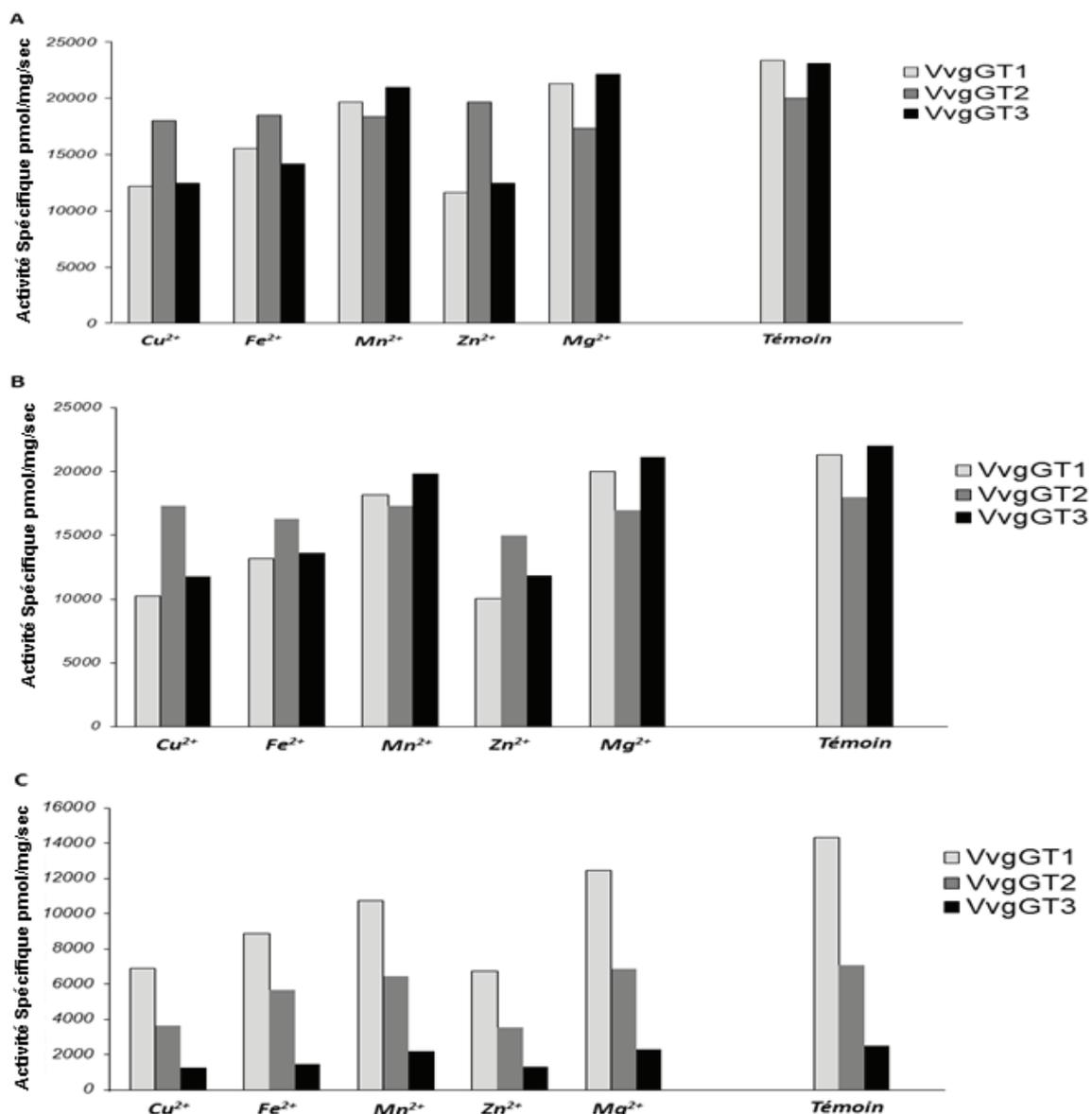
and 3 towards C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> acids and VvgGT2 towards C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> ones. Therefore we can hypothesize that glc-esters of hydroxycinnamic acids and gallic acid could be metabolic intermediates necessary for the synthesis of tartaric esters of hydroxycinnamic acids and the galloylation of PAs, respectively.

The remaining question is how these precursors give rise to the final biosynthetic products. Each time the protein involved in transesterification with glc-ester as acyl donor was identified, *i.e.* avenacin synthesis in oats, glc-polyester in wild tomato, sinapate esters in *Brassicaceae*, the genes encoding glucose-acyltransferases were shown to belong to the serine carboxypeptidase-like (SCPL) protein family (Mugford *et al.*, 2009; Li and Steffens, 2000; Lehfeld *et al.*, 2000; Shirley and Chapple, 2003; Milkowski *et al.*, 2004). Future studies to go on deciphering the PA galloylation steps and formation of hydroxycinnamic esters will include the study the SCPL genes identified in the transcriptomic screening of grapevine hairy roots over expressing *VvMybPA1* and *VvMybPA2* (Terrier *et al.*, 2009).

Les paragraphes suivants (résultats et discussion) ne feront pas partie de l'article, parce qu'éloignées du fil conducteur de l'article (effet des ions, donneur de sucre).

### **Effet de l'addition de sel**

Dans la littérature, la présence d'ions Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ou d'autres cations divalents est nécessaire pour le fonctionnement optimal d'un certain nombre de glucosyltransférases (Mollicone *et al.*, 1990). Ils participent en liant le glycosylnucléotide négativement chargé à la protéine. Les réactions enzymatiques ont été effectuées en présence d'acide gallique et d'acide caféique en tant que substrat potentiel.



**Figure 31.** Effets de l'addition d'ions (1mM final) au milieu réactionnel des VvgGTs à (A) pH 6.5 (B) pH 7.5 et (C) pH 8.5

Dans le cas de nos enzymes d'intérêt, l'addition de 1 mM de sel (Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>) en milieu réactionnel conduit à une perte de 3% à 52% de l'activité, en fonction de l'enzyme, quel que soit le pH (Figure 31). L'ajout de Zn<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> entraîne une perte de plus de 47% de l'activité, tandis que seul un léger effet a été observé lorsque nous avons ajouté du Mg<sup>2+</sup>. Le tableau 8 montre les pourcentages d'inhibition de l'activité enzymatique des 3 VvgGTs en fonction du pH et des différents ions ajoutés en comparaison à une réaction témoin ne contenant pas des suppléments d'ions. Les activités des VvgGT1 et VvgGT3 ont été plus affectées que l'activité de la VvgGT2. Les taux d'inhibition des activités enzymatiques sont beaucoup plus élevés à pH alcalin.

**Tableau 8.** Taux d'inhibition de l'activité enzymatique des 3 VvgGTS en pourcentage en fonction du pH et de l'ion ajouté au milieu réactionnel.

	VvgGT1			VvgGT2			VvgGT3		
	pH6,5	pH7,5	pH8,5	pH6,5	pH7,5	pH8,5	pH6,5	pH7,5	pH8,5
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	48	52	52	10	4	48	46	47	49
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	33	38	38	8	9	20	39	38	41
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	16	15	25	8	4	9	9	10	14
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	50	53	53	2	17	50	46	46	49
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	9	6	13	14	6	3	4	4	9

De nombreuses études montrent les effets d'ajout d'ions métalliques divalents sur les activités enzymatiques de glucosyltransférases purifiées (McIntosh et Mansell, 1990 ; Larson, 1971 ; Jonsson *et al.*, 1984 ; Teusch *et al.*, 1986 ; Parry *et al.*, 1994 ; Do *et al.*, 1995). L'addition de 1 mM de Mg<sup>2+</sup> ou Ca<sup>2+</sup> n'a eu qu'un léger effet sur la glucosylation de la quercétine, tandis que l'ajout de Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> à la même concentration a provoqué une réduction jusqu'à 96% de l'activité. En outre, l'ajout de Cu<sup>2+</sup> à des concentrations de 0,1 et 0,01 mM a provoqué une réduction de plus de 80% de l'activité de glucosylation de la quercétine par la UDP-Glucose: Flavonoïde 3-O-Glucosyltransférase de *Vitis vinifera* (Ford *et al.*, 1998).

Les résultats que nous avons obtenus sont comparables avec les résultats obtenus pour l'activité de l'UDP- Glucose: Cinnamate Glucosyltransférase de fraise lors de l'ajout d'ions Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, ou Zn<sup>2+</sup> (Lunkenbein *et al.*, 2006). Une forte diminution de l'activité de cette enzyme a été observée lors de l'ajout de 1 mM de sels et une inhibition quasi-totale de l'activité s'est produite après ajout de 10mM de Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> (Lunkenbein *et al.*, 2006).

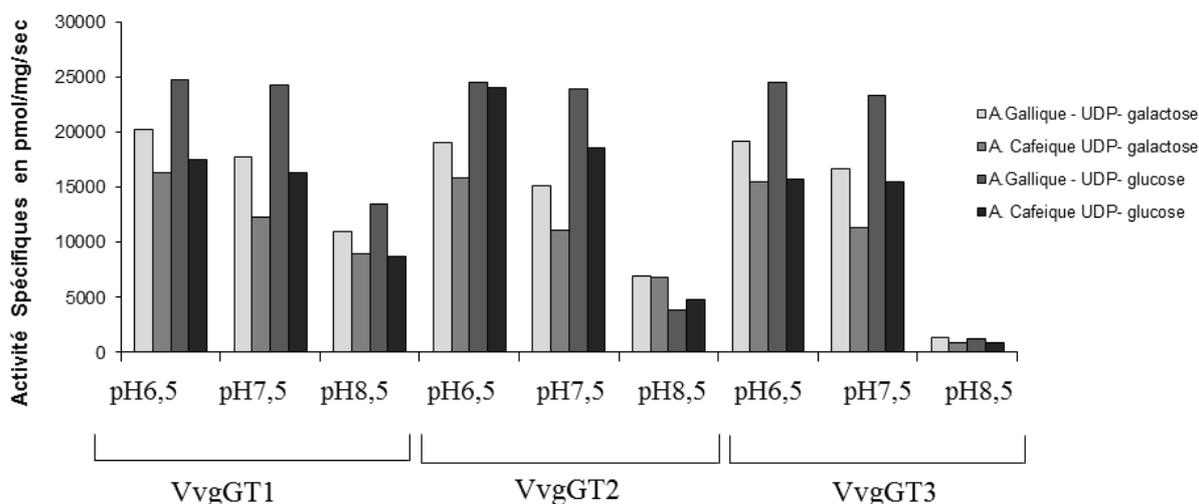
Ces résultats suggèrent la présence d'acides aminés chargés positivement au niveau du site de fixation des nucléotides donneur de sucre pour nos 3 VvgGTs (Pak *et al.*, 2006).

### **Effet de la substitution de l'UDP- glucose par d'autre UDP- Sucre**

Dans la littérature, le substrat donneur de sucre pour la plupart des glucosyltransférases validées fonctionnellement est un nucléotide-sucre. La partie nucléotidique est habituellement un diphosphonucléoside. La majorité des UGT caractérisées utilisent l'UDP-glucose en tant que donneur de sucre. D'autres UDP-sucre tels que l'UDP-galactose, l'UDP-acide glucuronique (Osmani *et al.*, 2008 ; Noguchi *et al.*, 2009), UDP-xylose et UDP-rhamnose, UDP-N-acétylgalactosamine UDP-N-acétylgalactosamine sont également utilisés par les UGTs végétales (Beyer *et al.*, 1981 ; Lim and Bowles, 2004; Bowles *et al.*, 2006). Offen *et al.*, 2006 ont démontré que l'UFGT peut exploiter un large panel d'UDP-sucre, tel que le UDP-5SGlc,

UDP-Man, UDP-Gal et UDP-GlcNAc mais aussi le dTDP-xylose. Cependant l'UDP- glucose reste le substrat le plus approprié aux activités enzymatiques.

Les protéines VvgGT1, VvgGT2, VvgGT3 sont catalytiquement actives en présence d'UDP-galactose comme donneur de sucre (Figure 32). Toutefois, les données cinétiques des essais *in vitro* montrent que les enzymes présentent une meilleure activité lorsqu'elles sont en présence de l'UDP-glucose que lorsqu'elles sont en présence de l'UDP- galactose (Tableau 9). Le taux de variation de l'activité lorsque le donneur de sucre est l'UDP-galactose à la place de l'UDP glucose est sensiblement le même quelque soit l'enzyme, le pH ou le substrat phénolique.



**Figure 32.** Activité des GTs en présence de l'UDP- Galactose en tant que donneur sucre en substitution à l'UDP- glucose en présence de deux substrats potentiel : l'acide gallique et l'acide caféique.

**Tableau 9.** Diminution de l'activité enzymatique des 3 VvgGTS en pourcentage suite à une substitution de l'UDP- glucose par l'UDP - galactose.

	VvgGT1			VvgGT2			VvgGT3		
	ph=6.5	ph=7.5	ph=8.5	ph=6.5	ph=7.5	ph=8.5	ph=6.5	ph=7.5	ph=8.5
A. Gallique - UDP- galactose	14	17	19	12	16	14	17	25	33
A. Cafeique UDP- galactose	21	23	15	25	24	22	27	27	17

## 5. PERSPECTIVES

La localisation des VvgGTs catalysant la synthèse de glucose-ester, intermédiaire réactionnel supposé pour la galloylation de tannins et l'estérification de l'acide hydroxycinnamiques est importante pour compléter le schéma de biosynthèse dans la baie de raisin. Par ailleurs, la validation et l'analyse fonctionnelle des gènes *in vivo* restent nécessaires. Un méthodologie de

transformation par *Agrobacterium rhizogenes* a déjà été utilisée au laboratoire pour valider la fonction ou localiser les gènes de vigne dans un système homologue (Gomez *et al.*, 2009; Cutanda *et al.*, 2009; Terrier *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2011). Pour apporter ces nouveaux éléments, la localisation de la VvgGT3 fusionnée à une GFP et la transformation anti-sens des racines hairy roots est en cours avec *VvgGT3*. Cependant, le taux de galloylation des tanins des racines de vigne est relativement faible, de l'ordre de 3-4 %, et par conséquent ce modèle biologique n'est pas le plus approprié pour valider leur fonction. Une transformation transgénique de plant de vigne pourrait donc être nécessaire bien que plus lourde à mettre en oeuvre. L'analyse phénotypique (composition en flavonoïdes) des organes transgéniques produits après expression anti-sens des gènes candidats sera réalisée.

## **CHAPITRE 4 : LES ACYLTRANSFERASES**

## 1. INTRODUCTION

L'acylation est une modification commune et biochimiquement importante dans les voies de biosynthèse des métabolites primaires ou secondaires et impliquée dans leur diversification. Un grand nombre de petites molécules, sont sujettes à des O-, N-, C- ou S - acylations. Les acyltransférases catalysent le transfert d'un groupement acyle d'une molécule « donneuse d'acyle » sur une molécule dite « acceptrice d'acyle », ou transacylation ( $C_n$ -CO = acyle ;  $C_2$ -CO = acétyle). Le donneur d'acyle doit contenir une liaison activée, riche en énergie, venant de sa combinaison avec un composé tel le Coenzyme A ou le glucose par exemple. La transacylation aboutit à la formation d'une liaison ester, amide ou thio-ester.

Les acyltransférases se regroupent en familles ou superfamilles sur la base de leur structure primaire et de la présence d'éléments caractéristiques, ce qui correspond également à l'utilisation de plusieurs types de donneurs d'acyles. Chez les plantes, il existe trois principaux types de molécules activées :

- Les 1-O-acylglucosides. Les acyltransférases du type « Serine Carboxypeptidase Like » (SCPL) leur sont notamment spécifiques (Milkowski et Strack, 2004).
- Les « Acyl Carrier Proteins » (ACP), intervenant dans la synthèse des acides gras et des phospholipides (Cassagne *et al.*, 1994)
- Les Coenzymes A (CoA), largement majoritaires dans les réactions de transacylations, interviennent aussi bien dans le métabolisme primaire avec l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs par exemple, que secondaire, pour la synthèse des flavonoïdes, de la lignine ou d'alcaloïdes notamment (St Pierre et De Luca, 2000).

### 1.1. La famille des gènes d'acyltransférases de type BAHD chez les plantes

Chez les plantes, les acyltransférases CoA dépendantes ont été classées dans une superfamille d'acyltransférases appelée par St-Pierre et De Luca (2000) et D'Auria (2006) la superfamille BAHD. Ce sigle correspond à la première lettre des quatre premiers gènes de cette famille isolés chez les plantes. La déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase (DAT) et la benzyl alcool O-acétyltransférase (BEAT) catalysent l'acétylation des précurseurs de la vindoline et du benzyl-acetate chez *Catharanthus roseus* et *Clarkia breweri* respectivement (St- Pierre *et al.*, 1998 ; Dudareva *et al.*, 1998), tandis que l'antranilate N-hydroxycinnamoyl-benzoyltransférase (HCBT) catalyse la benzylation de l'antranilate pour la formation d'une phytoalexine (dianthramide) chez l'œillet (Yang *et al.*, 1997) ; l'anthocyane O-hydroxycinnamoyltransférase (AHCT) participe au transfert d'un hydroxycinnamate sur une anthocyane (delphinidine diglucoside) chez *Gentiana triflora* (Fujiwara *et al.*, 1998).

Ce type d'enzyme a été identifié chez de nombreuses plantes et catalyse l'acylation d'un large spectre de métabolites tels que des anthocyanes, divers esters volatils constituant le parfum des fleurs, des phytoalexines, des alcaloïdes, ou bien intervient dans la biosynthèse de certains esters hydroxycinnamiques et de la lignine présente dans toutes les plantes vasculaires.

Les acyltransférases BAHD caractérisées jusqu'à présent sont monomériques, avec une masse moléculaire variant de 48 à 55 KDa. Plusieurs acyltransférases d'anthocyanes (AAT) appartenant à cette famille ont été caractérisées fonctionnellement ainsi que localisées au sein du cytoplasme chez *Petunia hybrida* (Gerats *et al.*, 1984), *Gentiana triflora* (Fujiwara *et al.*, 1998), *Perilla frutescens* (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2000), *Arabidopsis thaliana* (Luo *et al.*, 2007) et *Medicago truncatula* (Yu *et al.*, 2008) ce qui est en accord avec l'absence de peptides de transit ou d'autres séquences d'adressage (D'Auria, 2006). Deux séquences consensus hautement conservées à travers la famille permettent de définir les membres de cette superfamille. La première est la séquence HXXXD, située dans le voisinage du site actif et le deuxième motif est constitué de la séquence DFGWG, situé près de l'extrémité C terminale de la protéine (Bayer *et al.*, 2004 ; Suzuki *et al.*, 2004, Unno *et al.*, 2007).

La recherche des BAHD potentielles chez les organismes séquencés ou dans les banques d'ADNc ou d'« Expressed Sequence Tag » (EST), montre que cette superfamille est spécifique des plantes et des champignons (St-Pierre et DeLuca, 2000). Ces analyses chez les plantes ayant leurs génomes séquencés ont également permis de mettre en évidence la particulière représentation de ces acyltransférases. Le génome d'*Arabidopsis* compte 64 gènes prédits pour coder des BAHD, dont 9 sont déjà caractérisés et deux décrits par une approche génétique, se basant sur les études de mutants correspondants (Tacke *et al.*, 1995; D'Auria, 2006 ; D'Auria *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2007 ; Luo *et al.*, 2009; Grienenberger *et al.*, 2009; Muroi *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009). Le riz (*Oryza sativa*) comprend au moins 119 gènes de BAHD putatives (D'Auria, 2006) et le peuplier en compte 94 (Yu *et al.*, 2009). Chez le raisin, 52 gènes codant potentiellement pour des BAHD ont été recensés (Tuominen *et al.*, 2011). Une acyltransférase impliquée dans la formation du méthyl anthranilate à partir d'anthraniloïl-coenzyme A et de méthanol a été caractérisée par Wang et DeLuca (2005) chez *V. labrusca*. A ce jour, 53 BAHD ont déjà été caractérisées chez un nombre important d'espèces différentes.

## **1.2. La famille des gènes d'acyltransférases de type SCPL chez les plantes**

Les acyl-transférases de type SCPL utilisent des esters  $\beta$ -acétal, généralement 1-O-esters de glucose, en tant que donneurs d'acyle (Strack et Mock, 1993; Steffens, 2000; Milkowski et Strack, 2004).

Ces activités peuvent être vitales pour la croissance normale et le développement des plantes ainsi que pour la synthèse de composés comme les polyesters de glucose chez la tomate (Li *et al.*, 2000), l'avénacine chez l'avoine (Mugford *et al.*, 2009) et les esters sinapiques chez *arabidopsis* (Lehfeldt *et al.*, 2000).

Les SCP-like (SCPL) tirent leur nom de leur similarité avec des sérines carboxypeptidases (SCP). La sérine carboxypeptidase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidique C-terminale des protéines ou des peptides à pH acide (Hayashi *et al.*, 1973, 1975; Bech et Breddam, 1989). Ces protéines possèdent un triade catalytique Ser-Asp-His indispensable à leur activité, décrit initialement pour la carboxypeptidase Y de levure (Endrizzi *et al.*, 1994) et des SCPs du blé (Liao et Remington, 1990). Les protéines SCP de blé et d'orge ont été particulièrement bien étudiées en raison de leur rôle dans la mobilisation des réserves de stockage de semences (Baulcombe *et al.*, 1987; Doan et Fincher, 1988; Degan *et al.*, 1994).

Chez les plantes, des SCPs et des SCPL ont été isolées à partir de plusieurs espèces, et leurs gènes respectifs ont été identifiés à partir d'EST (Expressed Sequence Tag) et de séquençages complets de génome. Les SCPLs se distinguent des SCPs par la présence, dans leurs séquences d'acides aminés, d'un domaine PF00450 détecté à l'aide du logiciel Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>).

Contrairement, aux acyltransférases de type BAHD, peu nombreuses sont les acyltransférases de types SCPL qui ont été identifiées, isolées et validées fonctionnellement. Le tableau 10 récapitule les différents travaux sur les acyltransférases de type SCPL.

**Tableau 10.** Différentes acyltransférases de type SCPL (ou acceptant des ester de glucose comme donneur d'acyle) étudiées dans la littérature.

En gris se retrouvent celles dont l'activité enzymatique a été caractérisée in vitro après expression hétérologue. Les systèmes hétérologues dans lesquels ont été exprimés ces gènes sont de même signalés. E.h. signifie Expression hétérologue.

Protéines	Noms Alternatifs	Acc #	Fonction	Validation	Reference
<i>S. pennellii</i> GAT	GAC	AAF64227	glucose acyltransférase	E. h. <i>S. cerevisiae</i>	Li et Steffens (2000)
<i>A. strigosa</i> AsSCPL1	SAD7	ACT21078	saponin acyltransférase	E.h. <i>N. benthamiana</i>	Mugford <i>et al.</i> (2009)
<i>A. thaliana</i> AT2G22980	SCPL13 /SST	AEC07386	1,2-disinapoyl-Glc acyltransférase	Analyse de mutant	Fraser <i>et al.</i> (2007)
<i>A. thaliana</i> AT2G23010	SCPL9/ SST	AEC07397	1,2-disinapoyl-Glc acyltransférase	Analyse de mutant	Fraser <i>et al.</i> (2007)
<i>A. thaliana</i> AT2G23000	SCPL10 / SAT	AEC07395	Anthocyanine acyltransférase	Analyse de mutant	Fraser <i>et al.</i> (2007)
<i>A. thaliana</i> AT2G22990	SCPL8/ SMT/ SNG1	AEC07394	sinapoyl- malate acyltransférases	E.h. <i>E. coli</i>	Lehfeldt <i>et al.</i> (2000)
<i>B. napus</i> SCT AY383718	SCT	AAQ91191	sinapoyl- choline acyltransférase	E.h. <i>E. coli</i>	Milkowski <i>et al.</i> (2004)
<i>A. thaliana</i> AT5G09640	SCPL19/ SCT /SNG2	AED91420	sinapoyl-choline acyltransférases	E.h. <i>S. cerevisiae</i>	Shirley et Chapple (2003)
<i>B. napus</i> AM706350	SCT / sct2	CAM91991	sinapoyl- choline acyltransférase	E.h. <i>N. tabacum</i>	Weier <i>et al.</i> (2008)
<i>G. triflora</i> AB267675	GentrSCPLAT2	BAF99698	anthocyanine acyltransférase	E.h. Cellules <i>Sj9</i>	Noda 2006, Brevet N° WO2007046148
<i>C. ternetea</i> AB267672	CtSCPLAT4	BAF99695	anthocyanine acyltransférase	E.h. Cellules <i>Sj9</i>	Noda 2006, Brevet N° WO2007046148
<i>A. thaliana</i> SNG1	AtSMT	AF275313	sinapoyl- malate acyltransférase	E.h. <i>S. cerevisiae</i>	Stehle <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhus typhina</i>	-	-	galloyltransférase	-	Niemetz et Gross (2001)
<i>Rhus typhina</i>	-	-	galloyltransférase	-	Frohlich <i>et al.</i> (2002)
<i>Brassica rapa</i>			sinapoyl- malate acyltransférase	-	Mock <i>et al.</i> (1992)
<i>B. napus</i>			sinapoyl- malate acyltransférase	-	Strack <i>et al.</i> (1990)

D'autres gènes ont été isolés sur la base de l'homologie de leur séquence d'acides aminés avec celles décrites dans la littérature, sans être validés fonctionnellement. On peut citer ceux issus du pois (Jones *et al.*, 1996; Cercos *et al.*, 2003), et du haricot (Granat *et al.*, 2003). Par ailleurs, deux SCPL de *Dyospiros kaki* ont été isolées par criblages différentiels (SSH) entre des fruits présentant des teneurs en PA différentes (Ikegami *et al.*, 2007; Akagi *et al.*, 2009).

Il a été démontré que plusieurs des protéines SCPL étudiées sont clivées en deux sous-unités (une petite sous-unité et une grande sous-unité) qui agissent ensemble comme un hétérodimère (Liao et Remington, 1990; Li et Steffens, 2000; Shirley *et al.*, 2001; Zhou et Li, 2005; Mugford *et al.*, 2009).

Un immunomarquage a permis de localiser la sinapoyl malate transférase, une SCPL, dans la vacuole centrale de feuilles d'arabidopsis (Hause *et al.*, 2002).

Ce chapitre a pour objet la caractérisation de 2 acyltransférases identifiées chez le raisin. Les résultats seront discutés au fur et à mesure de leur présentation.

## **2. RESULTATS ET DISCUSSION**

### **2.1. Identification des glucose- acyltransférases :**

Deux transcrits annotés « acyltransférases » ont été identifiés lors des criblages transcriptomiques entre des hairy-roots témoin et des hairy-roots où la synthèse de PA avait été induite par la surexpression de facteurs Myb (Terrier *et al.*, 2009). Le gène correspondant à l'oligonucléotide Vv\_10001107 sera appelé *VvGAT1*. Il est induit de façon significative à la fois par *VvMybPA1* (44ème gène le plus induit parmi les 306 induits significativement) et *VvMybPA2* (33ème gène le plus induit parmi les 159 induits significativement). Par contre, le gène correspondant à l'oligonucléotide Vv\_10005003, nommé *VvGAT2*, n'est induit de façon significative que par *VvMybPA2* (39ème gène le plus induit sur les 159 induits significativement). Pour resituer ces classements par rapport à d'autres gènes dont la fonction dans la voie de biosynthèse des PA est bien connue, l'*ANR* est en position 20 avec *VvMybPA1* et 31 avec *VvMybPA2*, une *F3'H* en position 41 pour *VvMybPA1* et 35 pour *VvMybPA2*. Le niveau d'induction de *VvGAT1* et *VvGAT2* est donc compatible avec une implication dans cette voie de biosynthèse.

La version annotée du génome 8x de la vigne a été accessible et publiée en août 2007 ([www.genoscope.cns.fr/vitis](http://www.genoscope.cns.fr/vitis)). Une nouvelle version 12X a été rendue publique en 2010 avec un certain nombre de différences, concernant à la fois les séquences (le génome a été complété) et l'annotation (modification des structures prédites intron-exons des gènes).

L'isolement de *VvGAT1* et *VvGAT2* s'est effectué en utilisant la première version du génoscope 8X. Lors de la mise à jour du « Genome Model », la structure intron-exon prédite pour *VvGAT1* a changé, modifiant de ce fait la séquence théorique de l'ADNc et de la protéine, cette nouvelle version du gène sera appelée *VvGAT1bis*. La séquence théorique de *VvGAT2* n'a en revanche subi aucun changement.

Dans la version 8X, *VvGAT1* correspond à *GSVIVT00038626001* et se trouve sur le chromosome 3 en position 7837681 à 7846292, tandis que dans la version 12X, *VvGAT1bis* correspond à *GSVIVT01037059001* et se trouve sur le chromosome 3 en position 8250666 à 8259277. En ce qui concerne *VvGAT2*, dans la version 8X, il correspond au gène *GSVIVT00001507001* sur le chromosome 3 en position 7363327 à 7372370. Dans la version 12X, il correspond au gène *GSVIVT01037791001* sur le chromosome 3 en position 7949025 à 7958068. Les positions de ces deux gènes dans le génome sont très proches l'une de l'autre. Les glucosyltransférases décrites dans le chapitre 1 sont également regroupées en cluster sur le chromosome 3 entre les positions 6123955 et 6340269 (version 12X).

La notion de cluster fonctionnel a été introduite il y a un peu plus de 10 ans chez les plantes (Frey *et al.*, 1997). A ce jour, 5 clusters fonctionnels sont décrits dont celui pour l'avénacine, une molécule de la famille des saponines, dérivés triterpéniques (Osbourn, 2010). Tous correspondent à la synthèse de métabolites secondaires intervenant dans la défense des plantes. Dans le cas de l'avénacine, 5 des 6 loci identifiés chez les mutants déficients pour sa synthèse co-ségrègent (Mugford *et al.*, 2009). Il a été démontré que pour les trois premiers loci identifiés, les gènes sont espacés de 150 kb. Dans notre cas, la distance entre les clusters de *VvgGTs* et *VvGATs* est plus élevée, de l'ordre de 1000 kb et contient une cinquantaine de gènes prédits. Cette distance reste cependant faible à l'échelle de la taille du génome de la vigne (le chromosome 3 mesure 19 000 kb, et le génome complet 475 Mb). La position rapprochée de gènes qui sont fonctionnellement liés pourrait permettre leur transcription puis traduction plus rapide et synchronisée suite à un déenroulement de l'ADN nucléaire (Osbourn, 2010).

Les parties codantes des transcrits des *VvGAT1* et *VvGAT2* ont été amplifiées. Leur longueur respective est de 1389 et 1467 nucléotides, ils codent respectivement des protéines de 462 et 488 a.a. dont 33 et 42 aa de peptide d'adressage vacuolaire putatif (Annexe 1). Les deux *VvGATs* ont un poids moléculaire théorique de 48,6 kDa et de 50,2 kDa sans le tag d'adressage. Quant à *VvGAT1bis*, la partie codante du transcrit est d'une longueur de 1410 nucléotides. Il code une protéine de 469 a.a. dont 33 a.a. de peptide d'adressage vacuolaire putatif. *VvGAT1bis* a un poids moléculaire théorique de 51,5 kDa sans le peptide d'adressage.

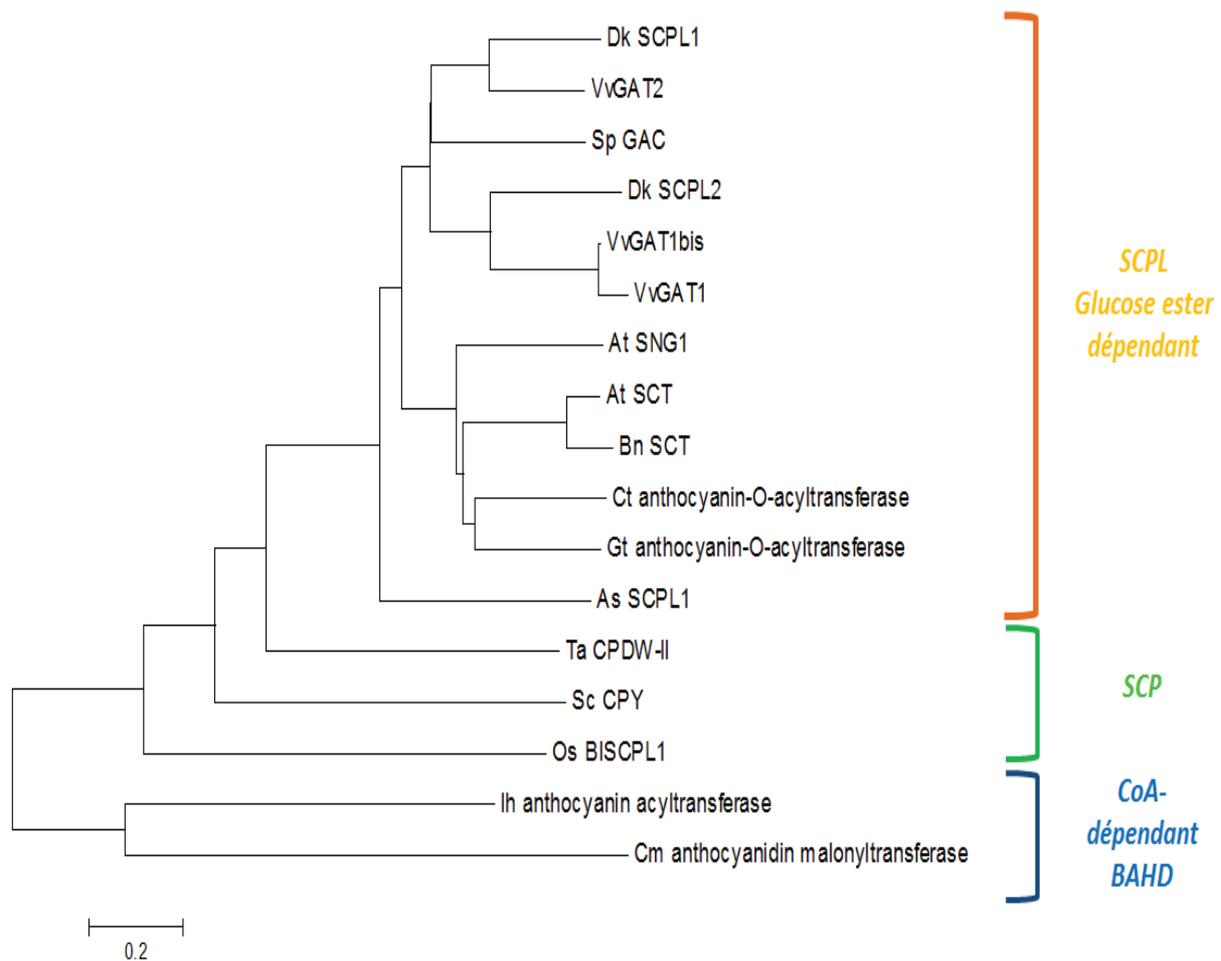
Le tableau 11 suivant montre les identités nucléiques et protéiques ainsi que les similarités protéiques dans les régions codantes entre les VvGAT1, VvGAT2 et VvGAT1bis.

**Tableau 11.** *Identité nucléique (IdN), identité/ similarité protéiques (Id/S a.a) des VvGAT1, VvGAT2 et VvGAT1bis. Les résultats sont exprimés en pourcentage.*

	VvGAT1		VvGAT2		VvGAT1 - Bis	
	Id N	Id/S a.a	Id N	Id/S a.a	Id N	Id/S a.a
VvGAT1	100	100	57.8	46.0/62.9	95.6	95.9/96.6
VvGAT2	57.8	46.0/62.9	100	100	59.8	49.0/66.6

Les séquences nucléiques et protéiques de VvGAT1 et VvGAT1bis sont très proches, seules les parties 3' de l'ADNc et donc C terminales de la protéine sont divergentes.

Les séquences protéiques entières de VvGAT1, VvGAT1bis et de VvGAT2 et celle de 13 autres acyltransférases issues de différents espèces et appartenant aux familles des BAHD ou des SCPL ont été comparées et une analyse phylogénétique a été réalisée (Figure 33).



**Figure 33.** Analyse phylogénétique d'acyltransférases et de SCP issues de différentes espèces. Les séquences des GAT de *Vitis vinifera* ont été alignées avec celles de *Triticum aestivum*-*Ta\_CPDWII* (P08819) (Breddam et al., 1987), *Solanum pennellii* glucose acyltransferase *Sp\_GAC* (AAF64227) (Li and Steffens, 2000); *Arabidopsis thaliana* sinapoylglucose : choline sinapoyltransferase *At\_SCT* (AY033947) (Shirley et al., 2001); *Arabidopsis thaliana* sinapoylglucose: malate sinapoyltransferase *At\_SMT*(AF275313) (Lehfeldt et al., 2000); *Saccharomyces cerevisiae* carboxypeptidase *Y Sc\_CPY* (1YSC) (X80836.1) (Barrell,B.G. et Rajandream,1994), *Dyospiros kaki* *Dk\_SCPL1* BAF56655 (Ikegami et al., 2007) et *Dk\_SCPL2* (BAH89272) (Akagi et al., 2009), *Avena strigosa* *As\_SCPL1* (FJ475130.1) (Mugford et al., 2009), *Brassica napus* 1-O-sinapoylglucose: choline sinapoyltransferase *Bn\_SCT* (AY383718) (Weier et al., 2008), *Gentiana triflora* 1-O-acylglucose:anthocyanin-O-acyltransferase BAF99698 (Noda et al., 2006 Brevet N° WO2007046148), *Clitoria ternatea* 1-O-acylglucose:anthocyanin-O-acyltransferase BAF99695 (Noda et al., 2006 Brevet N° WO2007046148), *Iris x hollandica* anthocyanin acyltransferase BAE72676 (Tanaka et al., 2006); *Chrysanthemum morifolium* anthocyanidin malonyltransferase AAQ63615 (Suzuki et al., 2004) et *Avena strigosa* ABG88965 (Mugford et al., 2009) en utilisant l'algorithme ClustalW. L'arbre phylogénétique a été créé par l'intermédiaire de MEGA4- package. La hauteur entre les embranchements indique la distance entre les nœuds.

Dans cet arbre, il apparaît très clairement que VvGAT1, VvGAT1bis et VvGAT2 se regroupent avec les membre de la famille des SCPL capables de catalyser des réactions d’acylation à partir d’un acyl-glucose sous forme ester (Lehfeldt *et al.*, 2000; Li and Steffens, 2000) et phylogénétiquement distincts du cluster des acyltransférases de type BAHD qui sont des acyltransférases CoA-dépendantes.

Les protéines les plus proches des VvGAT1 et VvGAT1bis d’une part, et de VvGAT2, d’autre part, sont respectivement DkSCPL2 et DkSCPL1. *DkSCPL2* a été identifié au cours d’un criblage transcriptomique différentiel (SSH) entre des variétés de kaki fortement et faiblement productrices de PA (Akagi *et al.*, 2009), et *DkSCPL1* a été mis en évidence au cours de ce même criblage ainsi qu’entre des fruits de kaki traités à l’éthanol et des fruits témoins (Ikegami *et al.*, 2007). Ce traitement a pour but de diminuer l’astringence des fruits en insolubilisant les PA et a également eu pour effet d’inhiber la voie de biosynthèse. Il faut noter que les PA des fruits de kaki, comme ceux de raisin présentent la particularité de contenir des sous-unités galloylées (Akagi *et al.*, 2009)

```
Dk_SCPL1 -----
VvGAT2 -----
Sp_GAC -----
VvGAT1bis -----
VvGAT1 -----
Dk_SCPL2 -----
At_SCT -----
Bn_SCT -----
At_SNG1 -----
As_SCPL1 -----
Ta_CPDW-II -----
Sc_CPY MKAFTSLLCGLGLSTTLAKAISLQRPLGLDKDVLQAAEKFGLDLDDLHLLKELDSNVLD 60
```

```
Dk_SCPL1 -----MAMAASPSIVKFLPGFD 17
VvGAT2 -----MATATPSQEEQSLKILFNRSRSMRMCFSI LLLLFFFTGVATSQSIVETLPGFP 53
Sp_GAC -----MARVTL-FLLLLLVYGVVSEHFIVETLPGFH 30
VvGAT1bis -----MAAKRPSNSSMFHG-----GLFLRLLLVVLSAN-AASAGSIVEYLPYG 44
VvGAT1 -----MAAKRPSNSSMFHG-----GLFLRLLLVVLSAN-AASAGSIVEYLPYG 44
Dk_SCPL2 -----MQVATATPCSSGRLLR-----LLAILAAALLLFSAPASSAGQSVKYLPGYD 47
At_SCT -----MRNLSFIVLFLTLFFIHHLVLDASLLVKSLPGFE 34
Bn_SCT -----MRNLYFLVLFPLS---ILILVDASLHVKYLPGLE 31
At_SNG1 -----
As_SCPL1 -----MEKLLVVVLLLVTLILALGAAAERTRVTHLKGFD 33
Ta_CPDW-II -----VEPSGHAADRIARLPGQP 18
Sc_CPY AWAQIEHLYPNQVMSLETSTKPKFPEAIKTKKDWFVVKNDALENYQLRVNKKIKDPKILG 120
```

```
Dk_SCPL1 GELPFKLETGYIGVGEIDEVQLFYFVSESQGDPSNDPLILWLTGGPGCSGFSA-LVYEIG 76
VvGAT2 GKLPFKLETGYISVGDVDDVQLFYFVIESERNRLDPLVWLWTGGPG-SGFSA-LVYEIG 111
Sp_GAC GKLPFTLETGYISVGEEEKVQLFYFFVQSERDPRNDPLMIWLTGGPGCSGLSS-FVYEIG 89
VvGAT1bis -NLTFKLETGYVSVGDSE---LFYFVIESQGNPQTDPPFLWLTGGPGCSSFNG-LIYEIG 99
VvGAT1 -NLTFKLETGYVSVGDSE---LFYFVIESQGNPQTDPPFLWLTGGPGCSSFNG-LIYEIG 99
Dk_SCPL2 GELPFHLQTYISVEDSE---LFYFVIESEGNPLEDPLMLWLTGGPGCSSLYG-IYEMG 103
At_SCT GPLPFELETGYVSVGESGDVELFYFVKSERNPENLPLMIWLTGGPGCSSICG-LLFANG 93
Bn_SCT GPLPFELETGYVSVGESGDVELFYFVKSESNPKDPLMIWLTGGPGCSSICG-LLFANG 90
At_SNG1 -----
As_SCPL1 GPLPFSLETGYVEVDETHGVELFYFVIESERKPAEDPVILWVSGGPGCSGLNA-LFFEIG 92
Ta_CPDW-II -AVDFDMSYITVDEGAGRSLFYLLQEAPEDAQPAPLVLWLNNGGPGCSSVAYGASEELG 77
Sc_CPY IDPNVTQYTGYL DVEDEDK-HFFFWTFESRNDPAKDPVILWLNNGGPGCSSLTG-LFFELG 178
```

Dk\_SCPL1 PLLFKVQSWKP---GTLPSLRASKNSWTKVANIIFIDQPVGTFGSY-GTTAAAYNSSDTV 132  
VvGAT2 PLAFDVEGYD----GILPTLKLNPYSWTKVASIIFIDAPVGTGFSY-AETSYGYNVSDTS 166  
Sp\_GAC PLTFDYANSS----GNFPKLELNSYSWTKVANIIFIDQPAGTGFSY-ANTSEAYNCNDTL 144  
VvGAT1bis PMEFDIHNYP---GGLPRLLPYKYAWTKTASILFLDAPVGTGFSY-STSDAGWSSSDTD 154  
VvGAT1 PMEFDIHNYP---GGLPRLLPYKYAWTKTASILFLDAPVGTGFSY-STSDAGWSSSDTD 154  
Dk\_SCPL2 PMEFDIHNYP---GGLPRLLPYKYAWTKTASILFLDAPVGTGFSY-STTQEGWPSSDTK 158  
At\_SCT PLAFKGDYEN---GTVPPLELTSFSWTKVANILYLEAPAGSGYSY-AKTRRAFESSDTK 148  
Bn\_SCT PLAFKGDYEN---GTLPPLELTSFSWTKVANILYLESPAGSGYSY-AKTRRAAETSDTK 145  
At\_SNG1 -----MANIIFLDQPVGSGFSY-SKTP-IDKTGDIS 29  
As\_SCPL1 PLKLDMASYAATGGKGFPLLYFEDAWTKASNMIFLDAPVAGGFSY-ARQTEGLNSTVTG 151  
Ta\_CPDW-II AFRVKPRGAG-----LVLNEYRWKVANVFLDSPAAGVGFYSYNTSSDIYTSGDNR 128  
Sc\_CPY PSSIGPDLKP-----IGNPYSWNSNATVIIFLDQPVNVGFSY---SGSSGVSNATVA 225

..... \*.. \*:\*\*

Dk\_SCPL1 AAAQVYKFLRKWLMYNPKFGAN--PLYVGGDLYSGITVPLLVTILDGIGSGSLPRMQLK 190  
VvGAT2 SAAQTYQFLRKWLTFHPNFAGN--PLYIGGDSYSGIVAPILIKDILHGLEVGLQPKIELQ 224  
Sp\_GAC SVTLTYDFLRKWLMDHPEYLN--PLYVGGDSYSGIFVALLTRKIYDGIIEVGRPRVNIK 202  
VvGAT1bis SALETYEFLRKWLIEHPKYLPL--QLYVGGDSYSGIIVPLVVKHIVDAIDEHTVPRFNLQ 212  
VvGAT1 SALETYEFLRKWLIEHPKYLPL--QLYVGGDSYSGIIVPLVVKHIVDAIDEHTVPRFNLQ 212  
Dk\_SCPL2 SSEQSYEFLLKWLLENPQYLKV--QLFVGGDSYAGKIVPLVTRLIADGNKNGGTPYLNK 216  
At\_SCT QMHQIDQFLRSWFVKHPEFISN--PFYVGGDSYSGKIVPGAVQQILLGNEKGLTPLINI 206  
Bn\_SCT QIHQIDQFLRSWFVDHPEFISN--SFYVGGDSYSGKIVPGVVQQISLGNEKGLTPLINIK 203  
At\_SNG1 EVKRTHEFLQKWLRSRHPQYFSN--PLYVGGDSYSGMIVPALVQEISQGNICCEPPINLQ 87  
As\_SCPL1 LGRHVRVFLQKWMQAHPELASN--PLYIGGDSYSGYTVTVSALEVAN--HPAASSELNKL 207  
Ta\_CPDW-II TAHDSYAFLAKWFERFPHYKYR--DFYIAGESYAGHYVPELSQLVHR----SKNPVINLK 182  
Sc\_CPY AGKDVTNFLELFFDQFPEYVNGKQDFHIAGESYAGHYIPVFASEILS----HKDRNFNLT 281

\*\* : \* . : : \* : : \* . :

Dk\_SCPL1 GYLLGNPLTDDFIDANSKIPIYAFRVNLLSDELYEDAIEVSCNG---DFVNVDFNNTNCVAV 247  
VvGAT2 GYLLGNPLTDYLIDDNSRIPIYHRVSLISDGLYKAAKETCNG---DYGNVDINNTLCVEA 281  
Sp\_GAC GYIQGNALTDRSIDFNGRVKYANHMGLISDKIYQSAKANCNG---NYIDVDPNNILCLND 259  
VvGAT1bis GYLVGSPPTDENINTNAKVFAHRLALISDELYEAAKENCNG---NYADVDPSTKCLSS 269  
VvGAT1 GYLVGSPPTDENINTNAKVFAHRLALISDELYEAAKENCNG---NYADVDPSTKCLSS 269  
Dk\_SCPL2 GMVLGSPRTDNIIDENSKVFAHRMALISDEMYENAKEACNG---SYSNAAPNNTACHLA 273  
At\_SCT GYVLGNPVTDKNIETNRYRVPFAHGMGLISDELFESELRSCG---KFFNVDPNARCSNN 263  
Bn\_SCT GYVLGNPAVRTNLEPNHRVFAHRMGLISDELHESLERNCG---KFFNVDPNARCSNG 260  
At\_SNG1 GYMLGNPVTYMDFEQNFRIPYAYGMGLISDEIYEPMKRICNG---NYNVDPSTQCLKL 144  
As\_SCPL1 GYMVGNARGEVNNDNACRIPLYHGMGLISDELYEALSSCVVGTDSKNKQQQSAARCSEA 267  
Ta\_CPDW-II GFMVGNGLIDDYHDYVGTFFFWNHGIVSDDTYRRLKEACLH----DSFIHPSACDAA 237  
Sc\_CPY SVLIGNGLTDPLTQYNYEPMACGEGGEPVLPSEECSAMED---SLERCLGLIESCYDS 338

. : \* . : : \* . :

Dk\_SCPL1 LQGIKENLQLLNEAQNFGPLCALAKPKGEG---IQWGAEAEFTDS-----LI 292  
VvGAT2 LQTIKMLLQINIAMIPEQCAFASPQTE---LQWDLRVQENTTMNY-----LL 328  
Sp\_GAC LQKVTRCLKNIRRAQILEPYCDLPLYMG-----ILQETPTNG-----Q 297  
VvGAT1bis LGEIQHCVKDLFRNDILEPKCVFESP-----EPTRRSLEDEKPG-----DFIL 311  
VvGAT1 LGEIQHCVKDLFRNDILEPKCVFESP-----EPTRRSLEDEKPG-----DFIL 311  
Dk\_SCPL2 IEEITRCIRDLEFRGNILEPRCLFVAPPQTESDAIHAERRSLQAQAEDEDEDGTLDFLL 333  
At\_SCT LQAYDHCMEIYSEHILLRNCVVDYVLADT---PNIRTDRRRVMKEFS-----VN 310  
Bn\_SCT LLAYHCISEIYIEQILLPNCKVDYVLADISQTLPNIRTSRRRELKEFS-----RN 311  
At\_SNG1 TEEYHKCTAKINIHHILTPDC----- 165  
As\_SCPL1 QQAISEATDLNPAHILEPACGADFSRAPYLSLTPSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS--YYYL 325  
Ta\_CPDW-II TDVA[TAEQGNIDMYSLYTPVNCI]TSSSSSS-----SSLSQQRSSRG----- 279  
Sc\_CPY QSVWSCVPATIIYCNAQLAPYQRTGR----- 364

:

Dk\_SCPL1 LQDIIPQ-----LTCRSSWMLSYIYMNDQVQALGVKEGTMNS-TWRRCA-KSLP 342  
VvGAT2 SLSRIPE-----LRCRSFSYVLSYKWLNDINVQNALHVQPGTVK--TWRRCP-KSFP 377  
Sp\_GAC [SVFPIAG-----PWCREKNIYISYVWANDKAVQKAL]NVREGTTL--EWVRCN-ESMH 346  
VvGAT1bis NTPKLEE-----FWCRNFNYALSIIWANDESVQEALNVRVGTVK--YWSRCN-KSLS 360  
VvGAT1 NTPKLEE-----FWCRNFNYALSIIWANDESVQEALNVRVGTVK--YWSRCN-KSLS 360  
Dk\_SCPL2 SPPRIQN-----LWCRAFNYVLAYEWGNDIAVQEALHVRQGTVA--YWMRCN-FSL 382  
At\_SCT DSSSLPP-----PSCFTYRYFLSAFWANDENVRRALGVKK--VG--KWNRCNSQNI 358  
Bn\_SCT DSSSLPP-----PSCFTYRYFLSAFWANDENVRRALGVKK--FG--KWSRCNTQNI 360  
At\_SNG1 DVTNVT-----PDCYYPYHLIECWANDESVREALHIEKSGK--KWRCN-RTIP 214  
As\_SCPL1 SLSSVRSRTPTEMLLECRVYGYELSYMWANDAENVRENLVREGTIGDGNWALCPEVPKL 385  
Ta\_CPDW-II RYPWLTG-----[SYDPCTERYSTAYNRDVMAL]HANVTGAMNYTWATCSDTINT 330

Sc_CPY	NVYDIRK-----DCEGGNLCYPTLQDIDDYLNQDYVKEAVGAEVDHYESC�FDINR	415
	: . . . . . : * . . . . .	
Dk_SCPL1	F-----YEEDVSSTVAYHKNFTRTRALRALIYSGDQALSIPYLGTEWINSIGVPIFD	394
VvGAT2	S-----YTENV DSTVAYHKNFTRTGLRALIYSGDHDLS TPYIGTLEWIKSLDVPVFD	429
Sp_GAC	YRGKERTESVYVDVPSVIDDHQHLT SKSCRALIYSGDHDMVPHLSTEEWIE TLKLP IAD	406
VvGAT1bis	Y-----TKDVQSVIDVHRYLSK KQLEVLVEVGDRDLVVPYPGAVEWIRLLNLTIVS	411
VvGAT1	Y-----TKDVQSVIDVHRYLSK KQLEVLVEVGDRDLVVPYPGAVEWIRLLNLTIVS	411
Dk_SCPL2	Y-----TKDIHSVSVS VHEYLKTIALQVLVASGDRDMVVPFVGTVKWIKALDLSVSE	433
At_SCT	YT-----FEIFNAVPHYV MN SLKGF RSLIYSGDHDSMV PFSSTQAWIRALNYSIVD	409
Bn_SCT	YT-----YDIHNAIPYHV NNSRKGFRALIYSGDHMMI PFSSTEAWIKSLNYSIVD	411
At_SNG1	YN-----HDIVSSIPYHM NNSISGYRSLIYSGDHDIAVPFLATQAWIRSLNYSPIH	265
As_SCPL1	HL-----TNDVPTTVPYHRRLTQRGYRALVYNGDHDLLMTHIGHAWIRSLGYPVVA	437
Ta_CPDW-II	HWH-----DAPRSM LPIYRELIAAGLR I WVFSGD TDAVVPLTATRYSIGALGLPTTT	382
Sc_CPY	NFLFAG-----DWMKPYHTAVTDDL NQDLPILVYAGDKDFICNWLGNKAWTDVLPWKYDE	470
	: ** . *	
Dk_SCPL1	TWR-----PWFVD--GQVAGYTQKYEKNSYSLTFATVKGAGETAPEYKRKEALAMVNRWF	447
VvGAT2	KWR-----PWYVD--GQIAGYTTKFMNDHYRLTYATLKGAGLTAPEYKHKESLALVDRWF	482
Sp_GAC	DWE-----PWFVD--DQVAGYKVKYLQNDYEMTYATVKGAGHTAPEYKPEQCLPMVDRWF	459
VvGAT1bis	PWR-----PWFVD--GEIAGYTEKHSQNGYRLTYATVKGAGHTAPEYRRECYMFKRWV	464
VvGAT1	PWR-----PWFVD--GEIAGYTEKHSQNGYRLTYATVKAS---TTIFYTFPSLFCQIES	461
Dk_SCPL2	YWR-----PWFLD--GQVQGYTEKYDNNGYLYTVTVKAGHTAPEYHRKQVYHLFDRWI	486
At_SCT	DWR-----PMMSS-NQVAGYTRTYAN---KMTFATIKGGGH-TAEYTPDQCSLMFRRWI	459
Bn_SCT	DWR-----PMMNS-NQVAGYTRTYAN---KMTFATIKGGGH-TAEYNPDQCSLMFKRWI	461
At_SNG1	NWR-----PWIN--NQIAGYTRAYSN---KMTFATIKGGGH-TAEYRPNETFIMFQRWI	314
As_SCPL1	PWR-----AWYSN--NEVAGFTVEYSN---NLTFATVKGAGHMAPESRPKQCLDMVRRWI	487
Ta_CPDW-II	SWY-----PWYDD--QEVGGWSQVYK G---LTLVSVRGAGHEVPLHRPRQALVLFQYFL	431
Sc_CPY	EFASQKVRNWTASITDE VAGEVKS YKH---FTYLRVFNNGH M VPFDPENALSMVNEWI	526
	: * . : : * . : * : . . :	
Dk_SCPL1	AGYPV-----	452
VvGAT2	AYYPI-----	487
Sp_GAC	SGDPL-----	464
VvGAT1bis	HYYPL-----	469
VvGAT1	K-----	462
Dk_SCPL2	HYYPV-----	491
At_SCT	DGEPL-----	464
Bn_SCT	DGESL-----	466
At_SNG1	SGQPL-----	319
As_SCPL1	SPAGKL-----	493
Ta_CPDW-II	QGKPM PGQTKNAT	444
Sc_CPY	HGGFSL-----	532

**Figure 34.** Alignement des séquences protéiques de VvGAT1, VvGAT1bis et VvGAT2 avec des protéines de type SCP et SCPL.

Les séquences des GAT de *Vitis vinifera* ont été alignées avec celles de *Triticum aestivum*-Ta\_CPDWII (P08819) (Breddam et al., 1987), *Solanum pennellii* glucose acyltransferase Sp\_GAC (AAF64227) (Li and Steffens, 2000); *Arabidopsis thaliana* sinapoylglucose : choline sinapoyltransferase At\_SCT (AY033947) (Shirley et al., 2001); *Arabidopsis thaliana* sinapoylglucose: malate sinapoyltransferase At\_SMT(AF275313) (Lehfeldt et al., 2000); *Saccharomyces cerevisiae* carboxypeptidase Y Sc\_CPY (1YSC) (X80836.1) (Barrell, B.G. et Rajandream, 1994), *Dyospiros kaki* Dk\_SCPL1 BAF56655 (Ikegami et al., 2007) et Dk\_SCPL2 (BAH89272) (Akagi et al., 2009), *Avena strigosa* As\_SCPL1 (FJ475130.1) (Mugford et al., 2009), *Brassica napus* 1-O-sinapoylglucose: choline sinapoyltransferase Bn\_SCT (AY383718) (Weier et al., 2008), et *Avena strigosa* ABG88965 (Mugford et al., 2009) en utilisant l'algorithme ClustalW. En bleu figurent les acides aminés composant le triade catalytique. En gris clair figurent les cystéines conservées. En vert figurent les zones de clivage identifiées dans les protéines At\_SCT et Ta\_CPDW-II. Les peptides encadrés en noir dans les séquences Sp\_GAC et Ta\_CPDW-II ont été identifiés dans les protéines mûres.

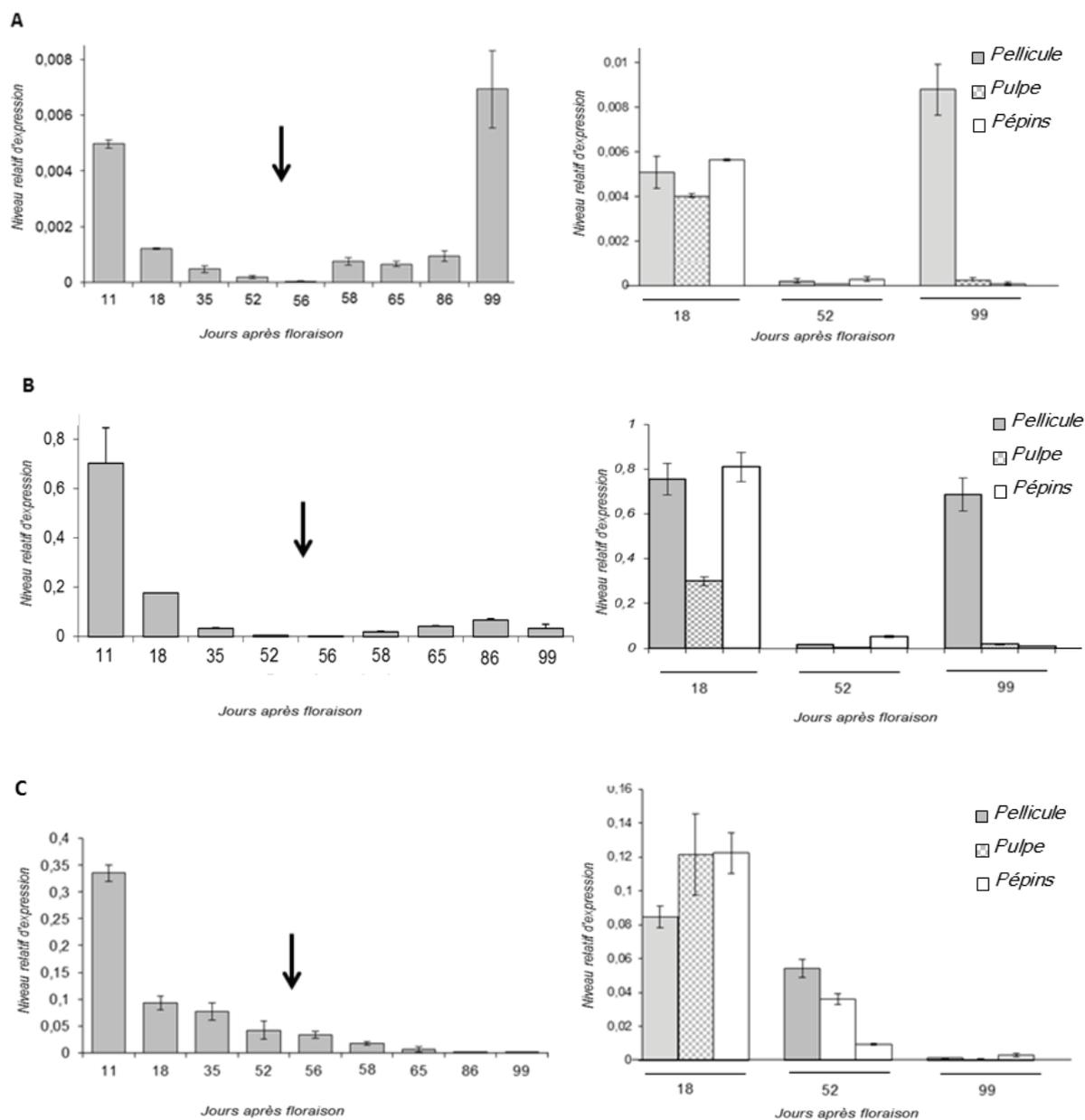
L'alignement des séquences de VvGAT1bis, VvGAT1 et de VvGAT2 avec neuf autres séquences (Figure 34) a révélé que le triade catalytique Ser-Asp-His identifié chez CPY (*S. cerevisiae*) est conservé chez VvGAT1bis (Figure 34). VvGAT1 et VvGAT2 ne contiennent pas l'histidine, dernier acide aminé de ce triade. Parmi les autres protéines alignées, DkSCPL1 est la seule à ne posséder aucun des acides aminés de ce triade.

Il est à noter également que la zone potentielle de clivage en deux peptides (en vert) semble très peu conservée entre les protéines, signe probable d'une faible pression de sélection sur cette région.

Alors que la partie C terminale des protéines semble très conservée chez les dicotylédones, elle diverge pour VvGAT1 à partir de l'acide aminé 444. Ceci correspondrait en fait à la non reconnaissance d'un site d'épissage et au début de la traduction d'un intron. Nous avons réussi à amplifier ce transcrit donc cette « erreur » de reconnaissance se produit effectivement dans la cellule. Par contre, il est difficile de prévoir si ce transcrit sera traduit en protéine et si cela se produit, si la protéine formée est fonctionnelle.

## **2.2. Expression de *VvGAT1* et *VvGAT2***

A partir de ces séquences, 6 couples d'amorces ont été définis afin de suivre par PCR quantitative l'expression de ces gènes au cours du développement (8 stades depuis les premiers stades de développement jusqu'à la maturité) de la baie et dans les différents tissus (pellicule, pulpe et pépin à 3 stades de développement : milieu de stade vert, véraison et maturation).



**Figure 35.** Profils d'expression obtenus par PCR quantitative des gènes (A) *VvGAT1*, (B) *VvGAT1bis* et (C) *VvGAT2* au cours du développement de la baie (Syrah).

Pour les trois transcrits, l'expression du gène a été mesurée au cours du développement (8 stades depuis les premiers stades de développement jusqu'à la maturité) et dans les différents tissus (pellicule, pulpe et pépin à 3 stades de développement : milieu de stade vert, véraison et maturation, respectivement 18, 52 et 99 jours après anthèse). La flèche indique la véraison. L'expression est normalisée par rapport au transcrit de référence *VvEF1alpha* (Terrier et al., 2005). Les valeurs d'expression correspondent à la moyenne de trois répliques, la barre indiquant l'écart-type.

Il est tout d'abord à noter que le niveau d'expression de *VvGAT1* est parallèle mais très faible comparé à celui de *VvGAT1bis*, de l'ordre de 100 fois moins. Ceci conforterait l'hypothèse que ce transcrit correspond à une « erreur » d'excision/épissage de la machinerie cellulaire.

Les *VvGATs* sont principalement exprimés avant la véraison durant les premiers stades de développement de la baie, en parallèle avec l'accumulation des PAs et des esters d'acides hydroxycinnamiques. *VvGAT1bis* présente une expression similaire dans le péricarpe et la pellicule de baies vertes et est plus faiblement exprimé dans la pulpe, ce qui coïncide avec les tissus accumulateurs de PA. En revanche *VvGAT2* présente une expression légèrement supérieure dans la pulpe et les péricarpes que dans la pellicule, ce qui est compatible avec une intervention dans la synthèse des PA et également des esters d'acides hydroxycinnamiques. Alors que les 3 *VvGATs* sont essentiellement exprimées au stade vert de la baie, de façon surprenante, *VvGAT1* et *VvGAT1bis* montrent un pic d'expression dans la pellicule à maturité. Ils pourraient être impliqués dans d'autres voies de biosynthèse dans la plante que celles que nous avons envisagées.

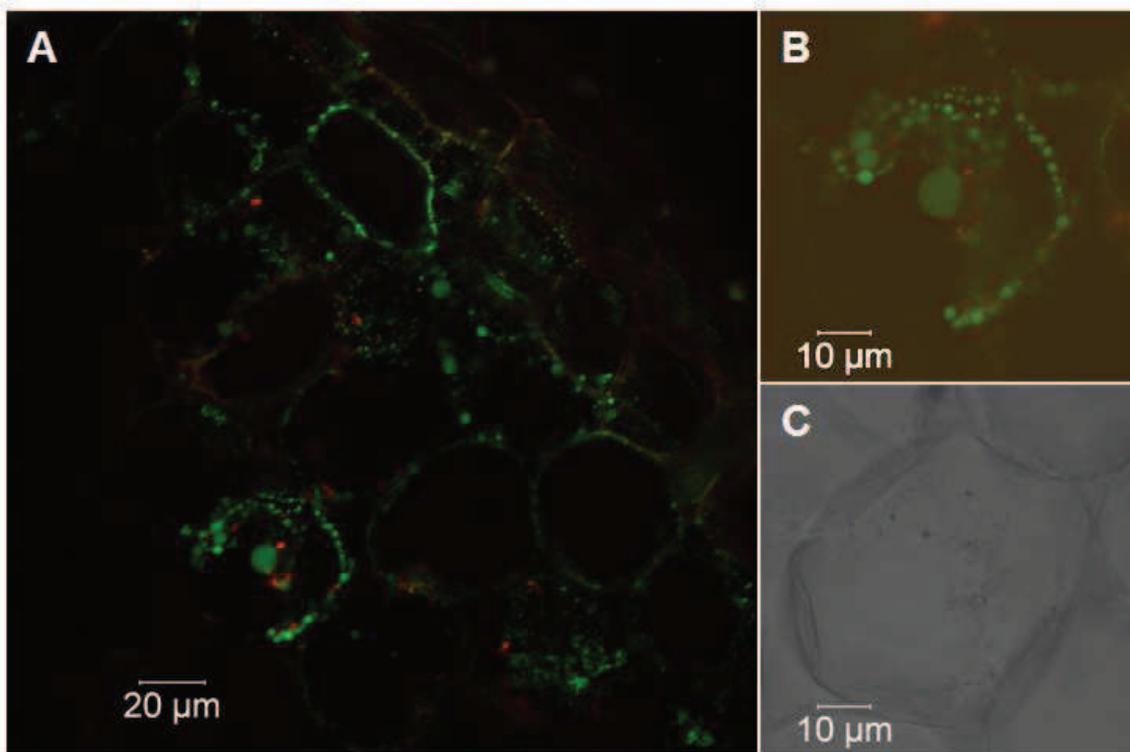
### 2.3. Localisation intracellulaire de *VvGAT1bis*

Pour examiner la localisation intracellulaire de la *VvGAT1bis*, l'ADNc de *VvGAT1bis* incluant le peptide d'adressage a été cloné en fusion à la *GFP* à son extrémité 3' (partie C-terminale de la protéine) sous le contrôle du promoteur 35S. L'analyse des racines transgéniques transformées avec ce plasmide a été effectuée par microscopie confocale. Dans les images observées (Figure 36), la fluorescence de la GFP se retrouve dans des structures circulaires, localisées dans le cytoplasme, indépendantes des plastides, en rouge sur l'image, et dont la taille varie entre 0,5 et 9  $\mu\text{m}$ . Les protéines GAT seraient donc localisées dans des vésicules cytoplasmiques de type pré-vacuolaire.

Dans la littérature, la synapoyl malate transférase (SMT) *d'Arabidopsis thaliana* a été immunolocalisée dans la vacuole des cellules des feuilles (Hausse *et al.*, 2002). Des acyltransférases utilisant des esters de glucose comme donneur d'acyl purifiées de *R. sativus* (Grawe *et al.*, 1992), de *Brassica rapa* (Mock *et al.*, 1992) et de *Brassica napus* (Strack *et al.*, 1990) ont montré des activités enzymatiques significatives à pH aux alentours de 6. Cela va de pair avec une localisation probable de ces enzymes dans la vacuole ou dans des organites cellulaires où le pH est plus acide que dans le cytoplasme. D'ailleurs ces enzymes diffèrent de celles de types de BAHD par la présence dans leurs séquences de peptides d'adressage (D'auria 2006).

La localisation intravésiculaire de l'enzyme *VvGAT1bis* suggère que l'acylation intervient dans un compartiment intracellulaire de type vésiculaire ou pré-vacuolaire. Ceci impliquerait donc un transport à la fois des esters de glucose mais aussi de la molécule récepteur d'acyle dans ce même compartiment. Les criblages transcriptomiques réalisés après surexpression de *VvMybPA1* et *VvMybPA2* ont révélé l'induction de plusieurs transporteurs. En plus d'un *MATE*, probablement l'orthologue de *TT12*, ces études ont mis en évidence l'induction de

plusieurs transporteurs de sucre. L'un de ceux là, un transporteur putatif d'hexoses, a été précédemment identifié comme *VvHT2* (Fillion *et al.*, 1999) et son profil d'expression dans la baie est discuté dans la littérature. Fillion *et al.* (1999) décrivent un maximum d'expression de ce gène une semaine après la véraison, alors que Hayes *et al.* (2007) ont signalé que son expression diminue constamment au cours du développement des fruits. Cependant la fonction du gène *VvHT2* reste à caractériser. Ces transporteurs de sucre pourraient être des candidats à tester pour le transport des esters de glucose vers la lumière des vésicules. D'ailleurs, un transporteur annoté «transporteur de saccharose» issu de *Japonica lotus*, localisé sur le tonoplaste, s'est révélé être capable de transporter des phenyl-glucosides (Reinders *et al.*, 2008).



**Figure 36.** Localisation de *GAT1bis-GFP* dans des hairy roots de vigne.

Observation de la fluorescence de la GFP (en vert) dans des cellules de *Vitis vinifera* surexprimant la protéine de fusion *GAT1bis-GFP*. La fluorescence rouge correspond à la chlorophylle, précisant la localisation des plastes. (B) correspond à une région zoomée de (A). (C) correspond à l'image (B) en lumière transmise.

## 2.4. Expression hétérologue des GATs

### 2.4.1. Dans *E. coli*

Parmi les différents organismes disponibles, l'entérobactérie *Escherichia coli* est l'hôte le plus employé pour la production des protéines hétérologues dans la recherche. Sa génétique

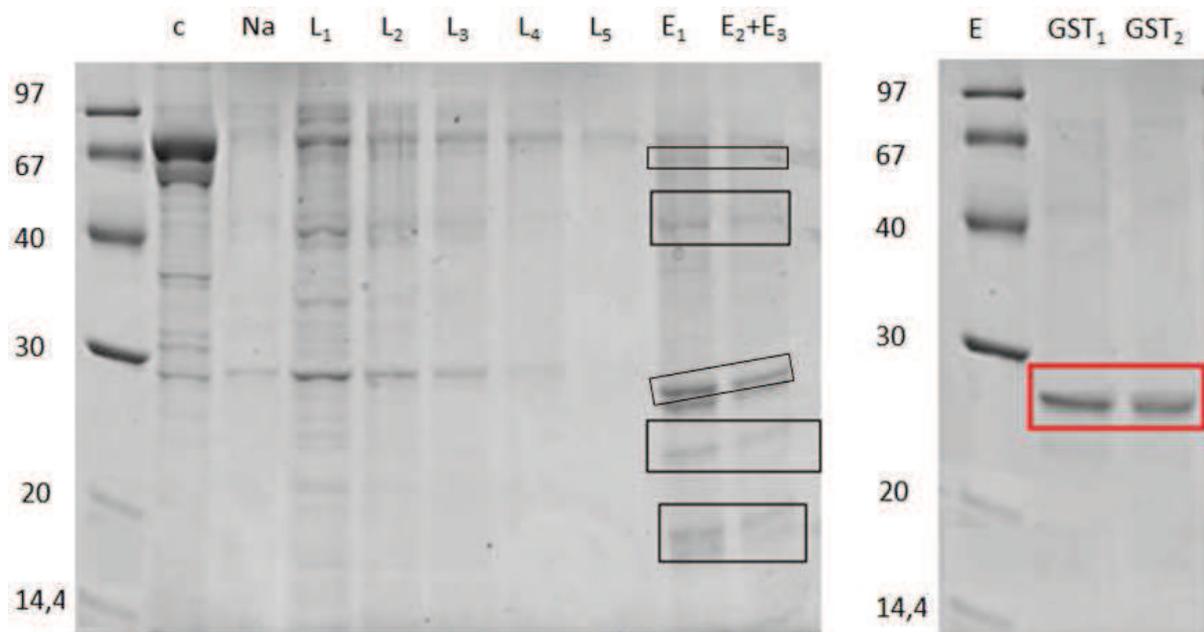
est très bien connue et il s'agit d'un très bon producteur de protéines recombinantes, poussant rapidement et à haute densité (Baneyx, 1999).

De plus, dans la littérature, une synapoylglucose : malate synapoyltransferase de type SCPL, décrite par Lehfeldd *et al.*, (2000), et une synapoyl-choline acyltransferase, décrite par Milkowski *et al.* (2004), ont été exprimées dans *E. coli* et ont été démontrées capable de catalyser une trans-estérification en transférant la fraction synapoyl du 1-O-sinapoylglucose sur le malate et la choline afin de former le synapoylmalate et la synapoylcholine respectivement.

Etant donné que nous avons obtenu rapidement des protéines recombinantes des glucosyltransferases actives avec ce système (chapitre 3), nous avons procédé à l'expression des VvGATs dans *E. coli*.

La construction a été effectuée par PCR en utilisant les amorces décrites dans le Tableau 4 (Chapitre 2). Les peptides d'adressage des protéines natives ne sont souvent pas reconnus comme tels par les procaryotes utilisés comme hôte pour la production de protéines hétérologues, et ce peptide n'est pas clivé, pouvant de ce fait rendre la protéine insoluble (Blaudeck *et al.*, 2001). Afin d'éviter la formation de corps d'inclusion, les fragments ont été amplifiés sans peptides d'adressage (Sriubolmas *et al.*, 1997; Nakanishi *et al.*, 2003). Le gène amplifié a par la suite été inséré dans le vecteur d'expression. Un séquençage a permis de confirmer l'obtention du vecteur portant notre fragment de *VvGAT1*. La purification de la protéine a été réalisée comme décrit dans matériel et méthode (Chapitre 2). Les fractions obtenues lors des différentes étapes de purification ont été séparées sur un gel acrylamide SDS-PAGE et les protéines sont mises en évidence par coloration au bleu de coomassie.

Les différents échantillons issus de la purification ainsi que le culot (débris cellulaires après broyage des bactéries) ont été déposés sur un gel SDS-PAGE afin de visualiser les diverses protéines produites. Des protéines de masses connues (Et) sont utilisées afin d'évaluer les masses molaires des protéines présentes dans les échantillons. Ces masses molaires varient entre 14 kDa et 97 kDa. Des protéines de diverses tailles sont apparues dans les échantillons de lavage et dans le culot. Les échantillons E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>+ E<sub>3</sub> correspondant à la purification après clivage de la GST montrent l'apparition de plusieurs bandes protéiques de masse moléculaire de 19kDa, 25 kDa, 29 kDa, 40 kDa et 67 kDa (encadrées en noir sur la Figure 37). Après le clivage par la thrombine, la GST est éluée par le glutathion dans les fractions GST<sub>1</sub> et GST<sub>2</sub> encadrées en rouge. Il est fort probable que les bandes à 29 kDa dans les échantillons E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>+ E<sub>3</sub> correspondent également à de la GST qui se serait décrochée de la résine.



**Figure 37.** Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) (coloration au bleu de coomassie).

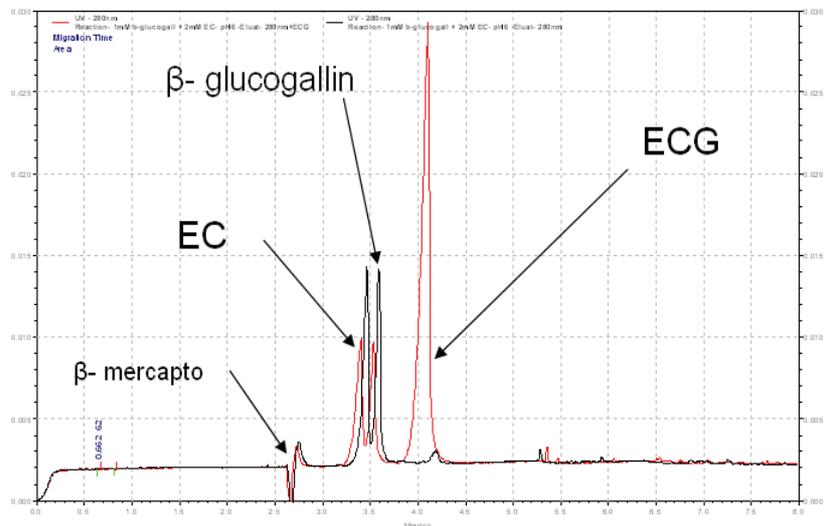
Analyse en SDS-PAGE révélée au bleu de coomassie du culot (C), du surnageant non fixé sur la résine (Na), des premiers lavages (L1, L2, L3, L4 et L5) avec du PBS 1X et des éluats E1, E2 + E3 après clivage de la protéine de fusion par la thrombine et libération du peptide d'intérêt. La GST est d'une taille de 29 kDa et figure encadrée en rouge sur le second gel présenté dans la figure. Avant dépôt sur gel, les protéines ont été quantifiées par la méthode de Bradford. Les quantités de protéines déposées sont : C=11.8 $\mu$ g, Na=6.44 $\mu$ g, L1 =9.6  $\mu$ g, L2 = 7.5 $\mu$ g, L3=6.28 $\mu$ g, L4= 5.4 $\mu$ g, L5 = 4.8  $\mu$ g, E1= 11.55 $\mu$ g, E2+E3= 7.5 $\mu$ g, GST1=6 $\mu$ g, GST2 = 4.2 $\mu$ g.

Sachant que le poids moléculaire de la VvGAT1 est de 48,6 kDa et compte-tenu de la présence d'une bande de cette taille dans l'éluat et pas dans les lavages, une série de tests enzymatiques a été mise en œuvre pour essayer de détecter une activité de cette protéine *in vitro*.

Plusieurs séries de réactions enzymatiques ont été menées sous deux conditions de température (30 et 37°C) à quatre pH (4.5, 5.5, 6 et 7.5) et durant des intervalles de temps allant de 30 minutes jusqu'à 24h en présence de  $\beta$ -glucogalline, épicatechine/épigallocatechine utilisés comme substrat. Les réactions ont été effectuées avec 40 $\mu$ g/ml, 60 $\mu$ g/ml et 100 $\mu$ g/ml d'enzyme issus de l'éluat E1, E2+ E3, ainsi qu'avec les cellules du culot traité avec 1% (v/v) Triton X-100 et du lysozyme (1mg/ml final).

En premier lieu, les produits de réaction à différents pH ont été injectés en électrophorèse capillaire sous les conditions décrites précédemment dans matériels et méthodes (chapitre 2).

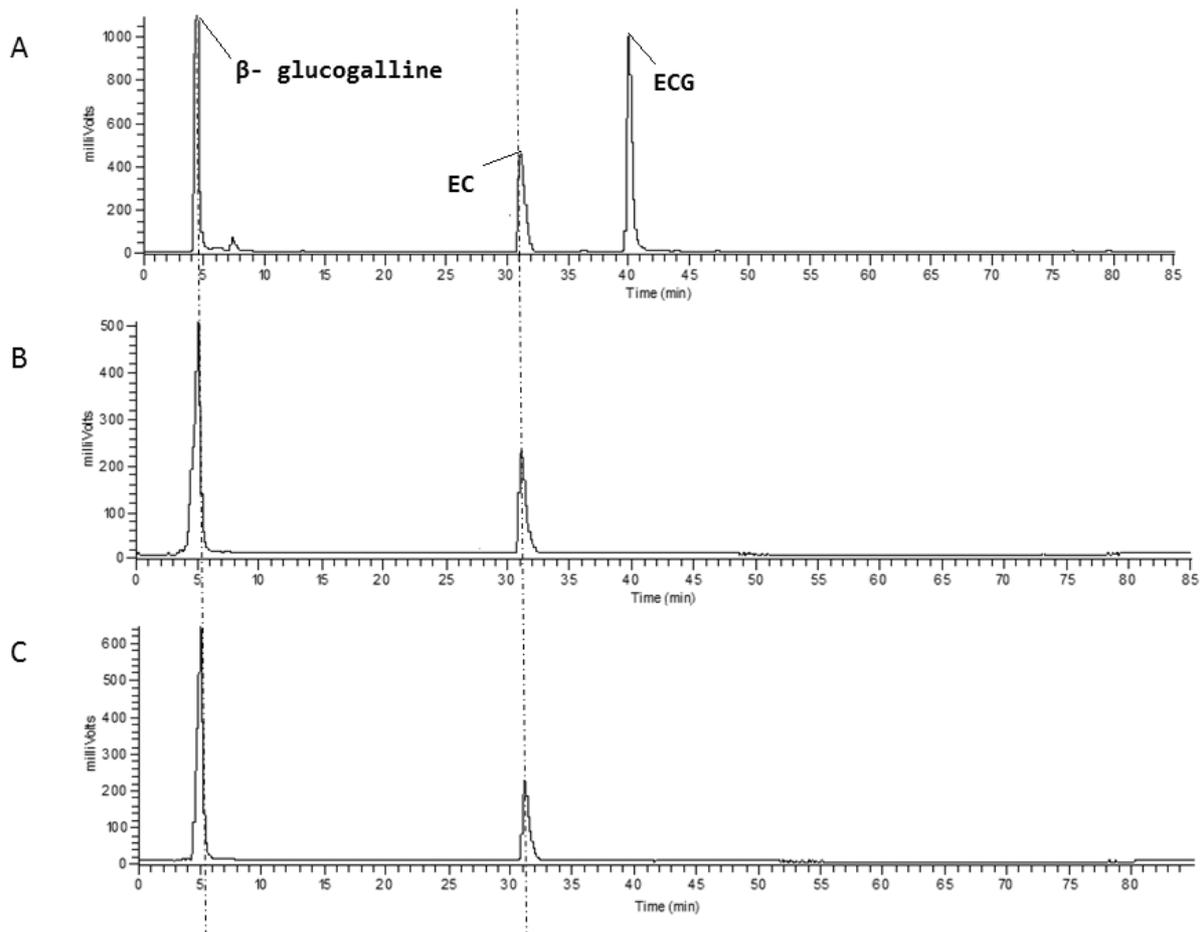
La figure 38 montre une superposition de l'électrophorégramme obtenu par injection des standards,  $\beta$ -glucogalline, EC (épicatechine) et ECG (épicatechine 3- O- gallate) à 1mM avec celui du milieu réactionnel à pH 6, après 30 min d'incubation. L'ECG est détectée 4.5 minutes après l'injection. Un petit pic est apparu au même temps de rétention que l'ECG lors de l'injection de produits à l'issue de la réaction enzymatique.



**Figure 38.** Electrophorégramme à 280nm montrant en rouge les produits standards : EC,  $\beta$ -glucogalline et l'ECG et en noir les substrats et les produits de réaction effectué à 30°C pendant 30 minutes en présence de VvGAT1 – extrait enzymatique, de 2mM EC et de 1mM  $\beta$ -glucogalline à pH=6.

Afin d'identifier le composé correspondant au pic qui est apparu au même temps de rétention que l'ECG, nous avons analysé la solution par HPLC-MS. Un standard contenant les deux substrats et le produit de réaction attendu a été de même injecté afin de comparer les résultats. L'EC et l'ECG ont un temps de rétention respectivement de 30.82 et de 40.08 et sont détectés en mode négatif sous forme de leurs ions  $[M-H]^-$  à  $m/z$  289 et  $m/z$  441. Quant à la  $\beta$ -glucogalline a un temps de rétention de 5 minutes et est détectée à  $m/z$  331.

L'analyse en HPLC–DAD–MS (280 nm) des milieux réactionnels avec l'éluat ou le culot comme extrait enzymatique ne montre aucune formation d'ECG (Figure 39). Les mêmes résultats ont été obtenus quelque soit le pH réactionnel.



**Figure 39** A) Profil chromatographique à 280 nm A) du standard (EC (épicatchine) + ECG (épicatchine 3- O- gallate) + β- glucogalline), B et C) des produits formés suite aux réactions enzymatiques effectuées respectivement en présence de VvGAT1- Culot et VvGAT1- Eluat produites dans *E. coli* et d'EC et de β-glucogalline à pH6.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'absence de produit de réaction. L'expression de protéines recombinantes pourrait s'effectuer dans différents compartiments le cytoplasme, le périplasme ou la sécrétion dans le milieu de culture. L'expression de protéines recombinantes dans le cytoplasme d'*E. coli* pourrait être accompagnée par un mauvais repliement de celles-ci, ce qui conduit à leur agrégation et à la formation de corps d'inclusion. Ce sont des particules denses de protéines agrégées, dont le diamètre est d'environ 1 μm. Ces corps d'inclusion peuvent contenir de 5 à 40% des protéines cellulaires totales. Le mécanisme de formation des corps d'inclusion reste mal connu. Les protéines localisées dans des corps d'inclusion sont ensuite très difficiles d'accès pour les étapes suivantes de broyage cellulaire et purification et donc de mise en évidence d'activité enzymatique.

Par ailleurs, les acyltransférases peuvent être sujettes à des maturations post-traductionnelles (clivage du peptide signal, formation de ponts disulfures et glycosylation) (Lehfeldt *et al.*, 2000). Si le système d'expression est couramment utilisé pour sa simplicité et son efficacité,

les cellules procaryotes ne peuvent normalement pas réaliser des modifications post-traductionnelles parfois nécessaires à l'activité de la protéine. Or, même si toutes les protéines de la famille des SCPLs ne semblent pas subir ce phénomène (Hause *et al.*, 2002; Stehle *et al.*, 2006), il s'avère que plusieurs des protéines SCPL dans leur plante hôte ou produites de façon hétérologue sont clivées en deux sous-unités (une petite sous-unité et une grande sous-unité) agissant ensemble comme un hétérodimère pour être fonctionnelles (Liao *et Remington*, 1990, Li et Steffens, 2000, Shirley *et al.*, 2001, Zhou et Li, 2005; Mugford *et al.*, 2009). D'ailleurs l'expression fonctionnelle d'AtSMT dans *E. coli* (Lehfeld *et al.*, 2000) n'a pas pu être reproduite par Stehle *et al.* (2008).

De plus, nous avons utilisé pour cette expression hétérologue dans *E. coli* la première version accessible du transcrit de *VvGAT1* (version 8X), codant pour une protéine qui ne contient pas le triade catalytique complet, et dont nous ne savons pas si elle peut être active.

Etant donné les résultats que nous avons obtenus durant nos premiers essais de l'activité de *VvGAT1*, nous avons opté vers une production chez un système eucaryote. Le principal avantage des systèmes eucaryotes sur le système d'expression bactérienne provient du fait que les levures sont capables d'effectuer les principales modifications post-traductionnelles qui sont associées aux organismes eucaryotes supérieurs. Le clivage des protéines, à la fois les pré- et les prépro-peptides peut être réalisé au cours de la synthèse de la protéine hétérologue.

#### ***2.4.2. Dans un système eucaryote***

Des études antérieures avaient montré que la levure est appropriée pour l'expression fonctionnelle des acyltransférases SCPL (Li et Steffens, 2000; Shirley et Chapple, 2003, Stehle *et al.*, 2008). Deux systèmes de productions eucaryotes ont été utilisés pour la production de *VvGAT1*: la production dans *P. pastoris* et la production dans *S. cerevisiae* (W2579 et INVSc).

##### *2.4.2.1. Dans P. pastoris*

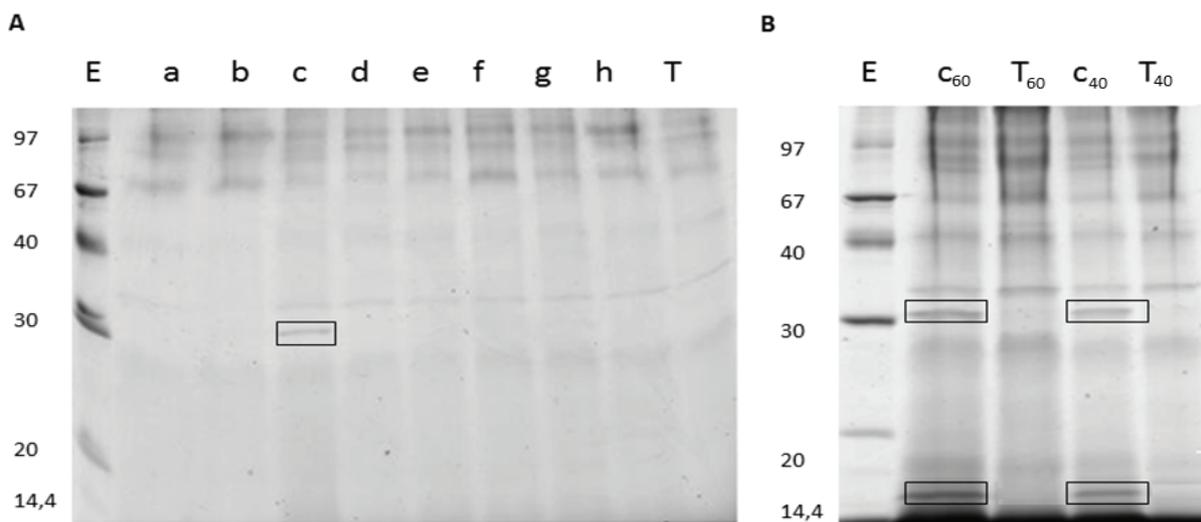
###### *2.4.2.1.1. Expression des GATs dans P. pastoris sans le tag d'adressage dans le système micro-fermenteurs*

*P. pastoris* fait partie des systèmes d'expression les plus utilisés dans la production des protéines hétérologues. A ce jour, plusieurs centaines de protéines d'origine très diverses tant microbiennes que végétales ou animales ont été produites avec succès via ce système.

Le vecteur d'expression pPicZ $\alpha$ A que nous avons utilisé est approprié pour l'expression de protéines hétérologues dans cette levure. C'est un vecteur navette *E. coli*/*P. pastoris*. Il se compose d'une origine de réplication chez *E. coli* et d'un marqueur de sélection qui est le

gène codant pour la résistance à la zéocine. Ce vecteur contient un signal de sécrétion ( $\alpha$ -factor) situé en amont du site de clonage de la protéine permettant l'adressage de la protéine hétérologue vers des compartiments extracellulaires. Hochstrasser *et al.* (1998) ont montré qu'il était nécessaire d'éliminer la partie correspondant au peptide signal pour permettre une bonne expression de la protéine; la *VvGAT1* a donc été amplifiée en supprimant le peptide d'adressage.

Huit clones positifs de levure et un témoin contenant le vecteur pPICZ $\alpha$ A sans le gène d'intérêt ont été mis en culture et conduits de façon identique en parallèle en mode micro-fermenteurs afin de comparer les niveaux respectifs de production et dans le but d'identifier les protéines produites par les clones contenant le gène d'intérêt sans l'être par le témoin. Après une première phase de production de biomasse en présence de glycérol (48h), la production de la protéine en présence de méthanol est induite pendant 96 heures. Les protéines contenues dans les surnageants ont été séparés sur un gel d'acrylamide en conditions dénaturantes et mises en évidence par coloration au bleu de coomassie (Figure 40.A). Aux alentours de 30 kDa, une bande intense apparaît chez le clone c sans toutefois apparaître dans les autres clones ni chez le témoin. La bande encadrée à ~30 kDa pourrait correspondre à un des peptides de clivage de la protéine *VvGAT1*. Le clone c a donc été sélectionné pour la suite des expérimentations.



**Figure 40.** Séparation et mise en évidence des différentes protéines produites suite à une production en mode micro-fermenteurs, sur un gel d'acrylamide SDS PAGE en utilisant la coloration du bleu de coomassie.

Un volume identique de surnageant (30 $\mu$ l) de chaque échantillon a été déposé dans les puits du gel. Le gel (A) montre les protéines produites par les 8 clones (a à h) contenant le vecteur pPicZ $\alpha$ A-*VvGAT1* en comparaison au témoin (T) contenant le vecteur pPicZ $\alpha$ A vide. Le gel B montre les protéines produites par le clone c en comparaison au Témoin T. Le surnageant a été concentré 40 (C<sub>40</sub> et T<sub>40</sub>) et 60 (C<sub>60</sub> et T<sub>60</sub>) fois avant d'être déposé sur le gel.

Deux tampons ont été testés durant la production des protéines d'intérêt: le tampon phthalate et le tampon tartrate. Les résultats des électrophorèses sur gel d'acrylamide ont montré des niveaux de production identiques (résultat non montré).

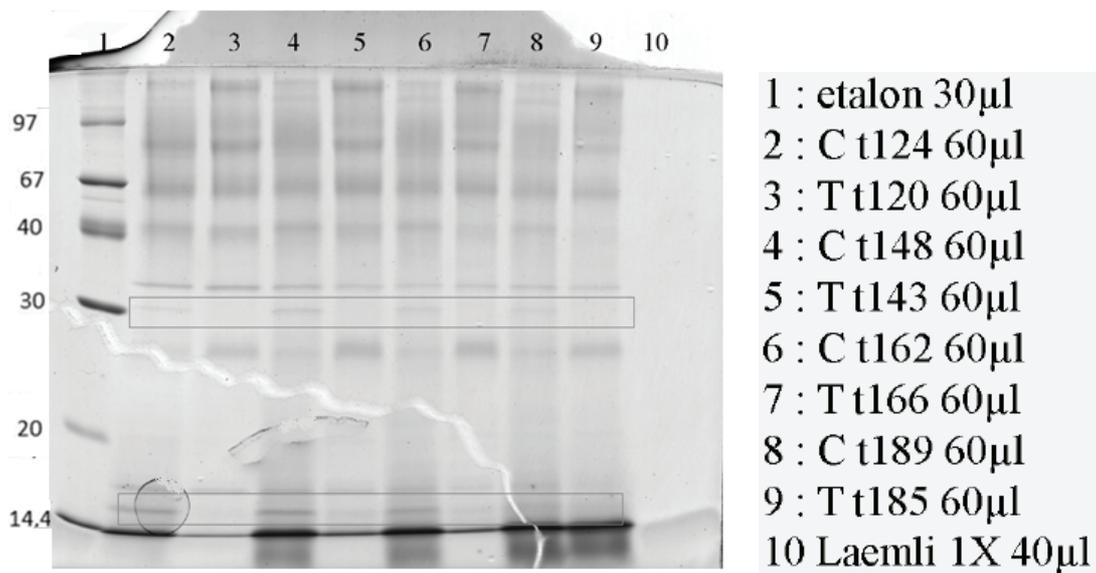
Une nouvelle production des clones c et t a été effectuée par le système de micro-fermenteurs en utilisant 16 tubes de cultures pour chacun. Les surnageants ont été concentrés 40 et 60 fois avant d'être déposés sur le gel, pour l'échantillon c et le témoin (Figure 40.B). Les protéinogrammes réalisés à partir de ces essais nous ont permis d'observer une bande à 17 kDa, ce qui peut laisser supposer que la protéine native VvGAT1 a bien été clivée en 2 peptides conformément aux données de la littérature pour d'autres protéines de la même famille. En 2000, Li et *al.*, ont montré que la diacylglycose transférase issue de la tomate peut être clivée en deux peptides de 30 et 24 kDa. Par ailleurs, Shirley et *al.* (2003) ont caractérisé fonctionnellement une sinapoylglycose: choline sinapoyltransférase d'*A. thaliana* clivée en deux peptides de 30 et 17 kDa. Récemment, Mugford et *al.*, (2009) ont identifié une Serine carboxypeptidase-like acyltransférase SCPL1 catalysant la synthèse d'avénacine. Ces auteurs ont pu identifier des peptides de taille 19, 29 et 33 kDa dans les échantillons présentant une activité enzymatique.

#### 2.4.2.1.2. Production de *p. pastoris* contenant VvGAT1 et le Témoin en fermenteur.

Afin d'augmenter le rendement de production protéique et compte tenu des effets d'interdépendance de divers facteurs physiologiques et environnementaux, physiques ou chimiques, qui peuvent influencer sur la production de la protéine hétérologue (Hensing et *al.*, 1995), nous avons procédé à la culture en fermenteur où un certain nombre de paramètres peuvent être maîtrisés tels que (i) des paramètres physicochimiques : pH, pO<sub>2</sub>, température, composition du milieu de culture, (ii) des paramètres physiologiques : taux de croissance, vitesse d'apport et nature de substrat carboné et (iii) du type de culture : culture en mode fed batch.

Les cultures de deux clones distincts ont été conduites dans des fermenteurs de 1,5 L de volume utile. Des échantillons ont été prélevés tout au long de la production en fermenteur. Les protéines présentes dans le surnageant de culture ont été séparées en gel d'acrylamide SDS- PAGE et mises en évidence par coloration au bleu de coomassie (Figure 41). Nous retrouvons dans tous les échantillons issus de la culture de *P. pastoris* contenant pPicZαA-VvGAT1 nos deux bandes d'intérêt, encadrées en noir, de masse approximative 30 et 17 kDa, absentes du témoin. D'après la réponse observée, le maximum de production de protéines a été obtenu à T= 148h. Ceci peut être expliqué par le fait que nous avons rencontré des

problèmes d'alimentation en méthanol quelques heures après T= 148, ce qui a pu induire une mort cellulaire partielle.

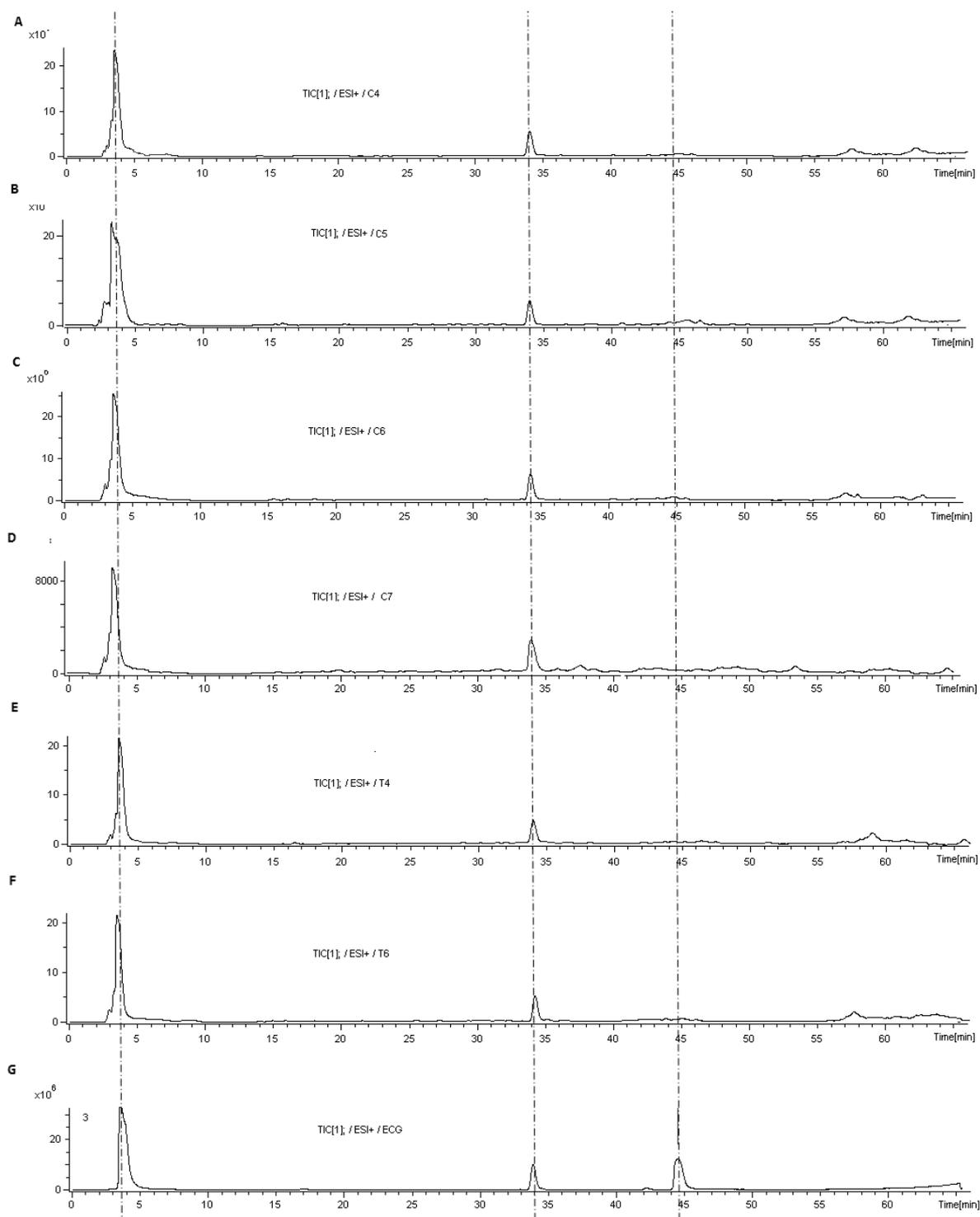


**Figure 41.** Séparation et mise en évidence des différentes protéines produites par le clone positif *c* contenant *pPicZαA-VvGAT1* et le témoin *t* contenant le vecteur *pPicZαA* vide, sur un gel d'acrylamide SDS PAGE en utilisant la coloration du bleu de coomassie.

Les échantillons sont prélevés à différents moments de la production en fermenteur. Les noms des échantillons correspondent au prélèvement au temps *t* (en minutes) des échantillons (*c* ou *t*). Un volume identique (30µl) de chaque échantillon a été déposé dans les puits du gel. Une gamme étalon de masses molaires connues est utilisé afin d'évaluer les masses des protéines présentes dans les échantillons. Les bandes encadrées correspondent à celles présentes uniquement dans l'échantillon *pPicZαA-VvGAT1*

#### 2.4.2.1.3. Etude de l'activité enzymatique des protéines

Suite à la production en fermenteur, une centrifugation était nécessaire afin de séparer le surnageant contenant la protéine d'intérêt du culot cellulaire. Le surnageant a été concentré et lavé deux fois par diafiltration à l'aide d'un centricon de 5 kDa. Des réactions enzymatiques ont été effectuées après avoir concentré les surnageants 10 fois, 40 fois et 150 fois. Les essais enzymatiques ont été effectués en présence d'EC et de β-glucogalline à différents pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5).



**Figure 42.** Profil chromatographique (TIC) à 280 nm des produits formés suite aux réactions enzymatiques effectuées en présence d'EC et de  $\beta$ -glucogalline.

Les chromatogrammes correspondent aux réactions enzymatiques réalisées en présence d'extrait pPicZaA-VvGAT1 clone c à (A) pH4.5, (B) pH5.5, (C) pH6.5, (D) pH 7.5, en comparaison aux réactions témoins T à (E) pH4.5 et (F) pH6.5. La durée de réaction était de 6h. Les résultats ont été comparés à (G) standard (EC +ECG+  $\beta$ - glucogalline). La  $\beta$ -glucogalline sort 4 minutes après l'injection, L'EC à 35 min et l'ECG à 45 minutes.

Les électrophorégrammes (Figure 42) des produits de réaction ne montrent aucune formation d'ECG. Aucun autre pic correspondant à un autre composé éventuellement formé lors de la réaction enzymatique n'est apparu. Ceci pourrait laisser penser que la protéine d'intérêt est absente ou inactive dans le milieu réactionnel. Pour le vérifier, une analyse protéomique des peptides présents dans l'échantillon pPicZ $\alpha$ A-VvGAT1 et pas dans l'échantillon témoin a été réalisée.

#### 2.4.2.1.4. Analyse protéomique des bandes

Etant donné les résultats obtenus suite aux réactions enzymatiques, une analyse protéomique combinant l'analyse peptidique par spectrométrie de masse des 2 peptides à 17 et  $\approx$ 30 kDA produits dans l'échantillon pPicZ $\alpha$ A-VvGAT1 et pas dans le témoin, suivie par une recherche des séquences identiques ou similaires sur all Entries NCBI et sur la banque Vitis-GAT1 (qui correspond à l'ensemble des peptides théoriques codés par la version 12X du génome de la vigne dans laquelle nous avons ajouté VvGAT1) ont été effectuées. Les résultats (Annexe 4) n'ont montré aucune similarité ou homologie significative des protéines présentes dans les bandes sélectionnées avec nos protéines d'intérêt. Ceci explique qu'on n'ait pas pu mettre en évidence l'activité enzymatique attendue.

#### 2.4.2.1.5. Discussion

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cet échec.

**Hypothèse 1** : Le vecteur utilisé pour la production de protéines recombinantes possède un peptide signal de sécrétion cloné en fusion traductionnelle avec le promoteur *AOX1*. Cet  $\alpha$ -mating factor est composé d'une pré-séquence de 19 acides aminés suivie d'une pro-séquence de 66 acides aminés contenant un site di-basique de coupure par l'endopeptidase KEX2 (Kurjan et Herskowitz, 1982). Le traitement du peptide signal se déroule en trois étapes. La pré-séquence est éliminée dans le réticulum endoplasmique par un signal- peptidase, puis KEX2 coupe la pro-séquence à l'intérieur du site dibasique Arg-Lys et enfin le site glu-Ala est clivé à son tour par la protéine Ste13 (Brenner et Fuller, 1992). L'efficacité du clivage du propeptide peut être diminuée par la présence de résidus proline à proximité des sites de coupures respectifs des peptidases. La protéine hétérologue contient alors des résidus additionnels dans sa partie N-terminale. Il arrive dans certains cas que l'utilisation de l'  $\alpha$ -mating factor ne permette pas de produire et sécréter correctement la protéine hétérologue (Martinez- Ruiz *et al.*, 1998).

**Hypothèse 2** : La production de protéines hétérologues dans *P. pastoris* peut être intra ou extracellulaire. Sachant que les levures secrètent naturellement très peu de protéines

endogènes, la sécrétion de la protéine hétérologue est considérée comme une première étape de purification. Cependant, eu égard aux problèmes de stabilité de la protéine hétérologue, dégradations éventuelles par les protéases de levures, et aux nombreuses modifications post traductionnelles que doivent subir les protéines secrétées mais que ne sont pas capables d'accomplir un hôte hétérologue (clivage, glycosylation, phosphorylation...), la sécrétion de protéines fonctionnelles qui ne sont pas naturellement dans leur organisme d'origine est plus difficile.

**Hypothèse 3** : La séquence VvGAT1 ne contient pas l'histidine qui fait partie du triade catalytique décrit initialement pour la carboxypeptidase Y de levure (Endrizzi *et al.*, 1994) et des SCPs et du blé (Liao et Remington, 1990) et présent dans toutes les protéines SCPL validées fonctionnellement et décrit comme étant indispensable pour le bon fonctionnement de la protéine. L'absence de ce triade peut expliquer en partie l'absence d'activité enzymatique. Cependant, cela n'explique pas qu'on ne retrouve pas la protéine produite en quantité détectable dans le milieu de culture.

**Hypothèse 4** : La séquence de VvGAT1 a été amplifiée sans la séquence correspondant à son peptide d'adressage permettant ainsi la fusion de VvGAT1 à l' $\alpha$ - mating factor codé par le plasmide et permettre une sécrétion de la protéine hétérologue dans le milieu extracellulaire. Or, il est admis que la protéine VvGAT1 peut subir un clivage en deux peptides comme cela a été décrit pour d'autres SCPL de plantes (Liao et Remington, 1990, Li et Steffens, 2000, Shirley *et al.*, 2003, Zhou et Li, 2005; Mugford *et al.*, 2009). Il peut donc être envisagé qu'un seul des deux peptides, probablement celui de 30 kDa, lié dans sa partie N-terminale à l' $\alpha$ - mating factor soit libéré dans le milieu extracellulaire, laissant l'autre partie de la protéine dans le milieu intracellulaire et rendant impossible la formation de l'hétérodimère. Cependant, ce peptide n'a pas été détecté dans le milieu extracellulaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, des réactions enzymatiques ont été effectuées avec le mélange culot lysé en présence de 1% (v/v) Triton X-100 et du lysozyme (1mg/ml final) et surnageant de culture concentré 60 fois dans les mêmes conditions de température et de durée précédemment décrites. Les produits de réactions ont été injectés en HPLC- masse. Aucun produit de réaction formé n'a été détecté.

La localisation intracellulaire des protéines dans les compartiments suite à leur transport intracellulaire, l'accès à ces protéines peut rester difficile. Il se peut que la libération de ces enzymes dans nos extraits ne se soit pas proprement réalisée.

**Hypothèse 5** : Le vecteur pPicZ $\alpha$ A utilisé pour le clonage de la VvGAT1 dans le but d'une expression dans *P. pastoris* a été conçu pour faciliter la sécrétion des protéines recombinantes

dans les surnageants. Ce vecteur contient une séquence signal qui couple en amont du gène d'intérêt et l'excrète vers le milieu extracellulaire.

Or il a été démontré que cette séquence signal inhibe très fortement la production de la sinapoyl-malate transférase par la levure (Stehle *et al.*, 2008). Ceci pourrait être aussi le cas pour notre protéine où cette séquence a interféré avec l'expression du gène dans la levure.

Face à ces échecs (absence de la protéine d'intérêt dans le milieu de culture et absence de détection d'activité enzymatique) et compte-tenu du fait qu'entre temps, la version 12X du génome a été rendue accessible, révélant un nouveau « gene model » pour *VvGAT1* (cf paragraphe 2.1), nous avons réalisé le clonage de cette nouvelle version du gène *VvGAT1bis* dans un autre système de production.

#### 2.4.2.2. Expression des *VvGATs* dans *S. cerevisiae* et purification de la protéine.

*Saccharomyces cerevisiae* est probablement l'organisme eucaryote le mieux connu. Son génome a été le premier à être complètement séquencé en 1996 (Goffeau *et al.*, 1996). Il est devenu un excellent modèle de recherche pour différents processus cellulaires (régulation du cycle cellulaire, fonction du cytosquelette, ...) en aidant à révéler des mécanismes analogues trouvés dans des organismes eucaryotes pluricellulaires. Dans la littérature, deux souches de levure ont déjà été utilisées pour produire des acyltransférases de type SCPL (Shirley et Chapple, 2003; Stehle *et al.*, 2006).

##### 2.4.2.2.1. *S. cerevisiae* W2579

La souche de levure *S. cerevisiae* W2579 (*MATa Δ prc1 leu2-3 Ieu2-112 ura3-52 vpl1-1*) construite par les laboratoires Carlsberg (Nielsen *et al.*, 1990) a été modifiée de telle sorte que le peptide d'adressage vacuolaire ne soit pas reconnu comme tel et que la protéine CPY soit excrétée dans le milieu. Cette même souche a été utilisée pour produire une sinapoyl : choline transférase (SCT) d'*arabidospis* fonctionnelle et excrétée dans le milieu (Shirley et Chapple, 2003). Nous nous sommes procuré cette souche auprès du Laboratoire Carlsberg. Le gène a été amplifié de façon à inclure une séquence consensus Kozak de levure (permettant la présence du codon initiateur indispensable pour l'initiation de la transcription chez la levure) et le peptide signal de *VvGAT1bis*. Le clonage a été réalisé dans pYES2, sous promoteur inductible par le galactose (*GALI*). La production de protéine a été réalisée sous les mêmes conditions que celles décrites dans Nielsen *et al.* (1990). Les cellules de levures hébergeant pYES2 et pYES2-*VvGAT1bis* ont été cultivées jusqu'à la phase stationnaire, puis lavées et mises en culture sur milieu inducteur contenant du galactose pour la production des protéines. Les extraits cellulaires et le surnageant du milieu ont ensuite été déposés sur un gel d'acrylamide afin de mettre en évidence les différentes protéines secrétées. Afin de tester

l'activité enzymatique des protéines produites, les surnageant des cultures hébergeant pYES2-*VvGAT1bis* ont été concentré 50 fois à l'aide d'un centricon. D'autre part le culot cellulaire a été conservé et les cellules ont été lysées. Les réactions enzymatiques avec les surnageants et les culots ont été effectués à différents pH (2, 4, 5, 6) en présence d'EC et de  $\beta$ -glucogalline sous les conditions décrites dans matériels et méthodes (30°C et 37°C de température). Les produits de réactions ont été analysés par HPLC-Masse et sur électrophorèse capillaire. Aucun nouveau produit n'a été détecté dans aucune des réactions effectuées contrairement à ce qui a été décrit dans Shirley et Chapple (2003) pour la SCT.

#### 2.4.2.2.2. *S. cerevisiae* INVSc1

De nouvelles expériences ont été effectuées en exprimant *VvGAT1bis* dans la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* de type INVSc1. Cette souche a été choisie car elle a été utilisée pour produire la sinapoyl : malate transférase d'arabidopsis (Stehle *et al.*, 2006) et ce système de production a été optimisé pour augmenter les taux de production (Stehle *et al.*, 2008)

La souche INVSc1 provient de chez Invitrogen. La même construction que celle introduite dans *S. cerevisiae* W2579 a été utilisée. Les cellules de levures hébergeant pYES2 et pYES2-*VvGAT1Bis* ont été cultivées jusqu'à la phase stationnaire ( $DO_{600} = 0.35$ ), puis lavées et mises en culture sur milieu inducteur contenant du galactose pour la production des protéines. L'extrait cellulaire ( $DO_{600} = 0.45$ ) a été broyé en présence d'un tampon de lyse (tampon phosphate, 100mM pH 5.5 + 0.1% TritonX-100 + 1mM EDTA + 1mMDTT) et par agitation mécanique en présence de billes afin de libérer les protéines intracellulaires.

Des tests enzymatiques ont été effectués en présence de  $\beta$ - glucogalline (2mM) et d'EC (2mM) d'une part et de l'acide tartrique (10mM) et de caffeoylglucose (produit de réaction obtenu avec les VvGTs du chapitre 1 à partir d'UDP- glucose (2.5mM) et d'acide caféique (2mM)) d'autre part afin de vérifier l'activité de l'enzyme.

Les gels d'électrophorèse SDS-PAGE n'ont montré aucune formation de protéines clivées ou entières et les injections en HPLC n'ont montré aucune production significative de produit de réaction.

Aucune activité enzymatique n'a pu être détectée après induction par le galactose de la production de protéine par les cellules eucaryotes de *S. cerevisiae* INVSC1 et *S. cerevisiae* W2579 contenant l'ADNc *VvGAT1bis* sous contrôle du promoteur *GALI*. Chez arabidopsis, plusieurs modifications ont été nécessaires pour augmenter le taux de production de l'AtSMT (1-O-sinapoyl  $\beta$ - glucose : L-malate sinapoyltransférase). L'adaptation en codons d'usage de

la levure pour la séquence de l'ADNc d'*AtSMT*, la fusion au peptide N-terminal d'adressage vacuolaire de la protéinase A de levure (*PEP4*) (Ammerer *et al.*, 1986), le clonage dans un plasmide multicopie *LEU2d* (Erhart et Hollenberg, 1983) ainsi que l'augmentation de la production en biomasse en cultivant la souche en fermenteur, ont permis d'augmenter le rendement de production de la protéine de 3900 fois en comparaison à l'ADNc d'arabidopsis non-modifié pour lequel la production d'enzyme et l'activité détectée étaient relativement faible (Stehle *et al.*, 2008). Par manque de temps et en absence de détection d'une quelconque activité, nous n'avons pas orienté nos travaux vers ces optimisations. D'autre part, la fusion de la protéine à un tag 6X histidine a provoqué une inactivation complète de l'enzyme *AtSMT*, comme cela a également été observé pour l'acyltransférase d'*A. sativa* impliquée dans la synthèse d'avénacine (Mugford *et al.*, 2009).

Dans notre cas, il est possible que le tag d'adressage et le site de clivage d'une protéine de vigne ne soit absolument pas reconnu par les levures pourtant utilisées avec succès pour produire des protéines d'arabidopsis de la même famille. Nous allons donc nous orienter vers la production hétérologue de ses protéines dans un système végétal. Dans la littérature, deux SCPL ont été exprimées avec succès dans des systèmes hétérologues végétaux. L'avénacine acyltransférase a été produite après surexpression dans *N. benthamiana* (Mugford *et al.*, 2009) et la sinapoyl-choline acyltransférase après expression transitoire dans des feuilles de *N. tabacum* (Weier *et al.*, 2008). Nous pouvons également envisager de produire ces enzymes en système homologue dans des hairy-roots obtenus après transformation de plantule de vigne par *Agrobacterium rhizogenes* A4 contenant le gène d'intérêt. Ce système apparaît le plus sûr pour que toutes les modifications post-traductionnelles soient effectuées correctement, notamment la reconnaissance des différents sites de clivage du peptide signal et entre les deux peptides formant l'hétérodimère.

Plusieurs autres hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'absence de détection d'activité. Il est envisageable que le milieu réactionnel ne soit pas optimal pour l'activité enzymatique de la VvGAT1bis. Les SCPL décrites dans la littérature ont été étudiées dans des milieux réactionnels à des pH allant de 5,5 jusqu'à 7,5, et à des températures de 30 ou 37 °C (Lehfeldt *et al.*, 2000; Shirley et Chapple, 2003; Weir *et al.*, 2008). Une balayage plus large des conditions de réactions testées devra être envisagée. De même, la présence d'ions ou autres cofacteurs dans le milieu réactionnel pourrait être exigée pour le bon fonctionnement de l'enzyme, bien que cela n'ait été considéré pour aucune autre des SCPL décrites dans la littérature.

D'autre part, le produit de réaction attendu est l'épicatéchine 3-O gallate. Ce composé est relativement peu soluble dans les milieux réactionnels testés. Par ailleurs, les flavan-3-ols ont la capacité d'interagir avec les protéines. Les interactions sont modulées par la taille, la

charge, le type de protéines, la structure et la concentration ainsi que par le solvant (Haslam, 1974; Saucier, 1997; Sarni-Manchado *et al.*, 1999; Sarni-Manchado et Cheynier, 2002; Canon *et al.*, 2008; Pascal *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2003). L'épicatéchine 3-O-gallate est le monomère ayant la plus grande capacité à interagir les protéines (Canon *et al.*, 2008), et donc sur les protéines présentes dans le milieu réactionnel, rendant ainsi sa détection délicate en fin de réaction. L'ajout du diméthylsulfoxyde 5% (v/v) (DMSO) dans le milieu réactionnel pour augmenter la solubilisation de la molécule et le traitement des produits de réaction au SDS (2% v/v) à chaud (95°C, 15 min) pour dénaturer les protéines et favoriser la libération des molécules qui pourraient y être fixées n'ont pas permis de détecter ni l'épicatéchine 3-O-gallate, ni d'ester caftarique dans les produits de réaction.

Il faut également envisager que l'épicatéchine ne soit pas le substrat de cette enzyme. En effet, l'étape de galloylation pourrait avoir lieu en amont dans la voie de biosynthèse (sur les dihydroxyflavonols, les leucoanthocyanidines ou les anthocyanidines par exemple) ou en aval, sur les polymères. Ces hypothèses n'ont pas été testées. Cependant, l'existence dans les pépins d'épicatéchine 3-O-gallate sous forme monomère ne plaide en faveur d'une galloylation qui surviendrait uniquement sur les polymères.

Enfin, malgré les nombreuses informations convergeant dans ce sens, il est possible que les VvGATs ne catalysent pas la réaction de galloylation des tannins ou l'esterification des acides hydroxycinnamiques. Dans ce cas, la transformation de plantes anti-sens suivi de leur phénotypage pourrait donner d'autres pistes quant aux réactions qu'elles sont capables de catalyser et leur rôle *in vivo*. Cependant, la transformation de plantes pérennes telle que la vigne reste un processus long et délicat.

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

## 1. BILAN DES RESULTATS:

Les composés phénoliques de la baie, et plus particulièrement les flavonoïdes (tanins condensés, anthocyanes, flavonols), constituent un des paramètres clés contrôlant la qualité organoleptique du raisin et du vin puisqu'ils sont impliqués dans la couleur, l'astringence, et la stabilité colloïdale.

Le suivi des composés phénoliques au cours du développement de la baie et la compréhension des mécanismes impliqués dans leur synthèse s'impose comme une approche complémentaire pour la maîtrise de la qualité du raisin et par la suite du vin. Certains de ces mécanismes ont été établis, chez les plantes modèles comme chez le raisin. Un nombre relativement limité d'étapes clés sont nécessaires à la biosynthèse de la structure de base de ces métabolites et les gènes correspondants sont aujourd'hui en grande partie connus. Cependant, certaines étapes de cette voie, notamment celles qui interviennent dans la « décoration » des structures de base telle que la galloylation et la polymérisation des tanins condensés ou la régulation spatio-temporelle fine de la composition en flavonoïdes restent à élucider.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans une démarche plus générale de l'équipe Polyphénols et Interactions de l'UMR Sciences Pour l'œnologie, en collaboration avec une équipe de généticiens (UMR Amélioration génétique et adaptation des plantes, Equipe Vigne, P. This), qui consiste à essayer d'identifier ces acteurs manquants à travers différents criblages couplant métabolomique, génétique et transcriptomique. Mon travail de thèse a consisté à valider l'hypothèse que quelques-uns des candidats issus de ces criblages (3 glucosyltransférases et 2 glucose-acyltransférases) intervenaient dans des étapes encore inconnues de cette voie de biosynthèse, en particulier la galloylation.

Au cours de ce travail, nous avons accumulé un certain nombre d'arguments en faveur de cette hypothèse.

### EN TERME DE PROFIL D'EXPRESSION

- L'origine même de l'identification de ces 5 gènes est un argument en faveur de leur implication dans la voie de biosynthèse des proanthocyanidines : ils sont induits par deux facteurs de transcription *VvMybPA1* et *VvMybPA2* régulant la voie de biosynthèse des proanthocyanidines.
- Ces 5 gènes sont exprimés pendant les stades très précoces de développement de la baie, de façon synchronisée avec l'accumulation des PA. Au niveau tissulaire, certains des isogènes ont même des profils d'expression parallèle au taux de galloylation des

PA, 3 à 4 fois plus galloylés dans les pépins que dans la pellicule. En revanche, d'autres isogènes s'expriment également de manière conséquente dans la pulpe. Il est envisageable qu'ils puissent intervenir dans l'estérification d'autres composés phénoliques, par exemple pour la synthèse des esters tartriques d'acides hydroxycinnamiques

#### EN TERME DE POSITION SUR LE GENOME ET DE GENETIQUE

- Ces 5 gènes sont localisés sur le chromosome 3, et le groupe des 3 glucosyltransférases et celui des 2 glucose-acyltransférases ne sont espacés que de 1000 kb. Il pourrait s'agir d'une co-localisation reflétant l'existence d'un cluster fonctionnel comme cela a déjà été décrit chez les plantes pour la synthèse de métabolites secondaires (Osborn, 2010).
- Des travaux menés en parallèle en collaboration avec les collègues généticiens ont permis d'identifier un QTL pour le taux de galloylation des PA sur cette portion du chromosome (travaux de thèse de Y.F Huang, en cours de rédaction). Des approches de génétique d'association ont montré que des SNPs dans la séquence de *VvGAT2*, identifiés dans les séquences de génomes de cépages d'une core-collection, étaient liés significativement au caractère taux de galloylation (travaux de master de G. Carrier).

#### EN TERME DE COMPARAISON DE SEQUENCE AVEC DES PROTEINES D'AUTRES PLANTES

- Les glucosyltransférases présentent de forts taux de similarité avec des glucosyltransférases capables de synthétiser des glc-ester.
- Les glucose-acyltransférases présentent de forts taux de similarité avec des acyltransférases de type Serine Carboxypeptidase Like dont la fonction est de transférer un groupement acyl depuis un glc-ester jusqu'à une molécule acceptrice.

Le couplage de ces deux activités enzymatiques en cascade a déjà été décrit pour la synthèse de quelques composés secondaires et notamment les esters d'acides sinapiques chez les *Brassicaceae* (Lehfeldt *et al.*, 2000; Shirley et Chapple, 2003; Milkowski *et al.*, 2004; Weier *et al.*, 2008). Les SCPL les plus proches de celles de vigne en termes de séquence ont été identifiées chez le kaki au cours de criblages différentiels entre fruits présentant des teneurs contrastées en PA.

#### EN TERME DE VALIDATION DE FONCTION

-Les 3 glucosyltransférases ont été produites de façon hétérologue et sont capables de former des glc-ester *in vitro* en utilisant comme substrat des acides phénols de type C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> tel que l'acide gallique et de type C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> comme les acides caféique, coumarique et ferulique, que l'on peut rencontrer dans le raisin sous forme esters avec les PA ou l'acide tartrique, respectivement.

## EN TERME DE LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES ENZYMES

- L'utilisation de protéines de fusion GFP a permis de localiser une des acyltransférases dans des vésicules situées dans le cytoplasme. Ce type de vésicules ou provacuoles ont déjà été décrites comme une des formes d'acheminement possible des PA ou de leur précurseur vers la vacuole, leur lieu de stockage final (Zhao *et al.*, 2010).

### 2. PERSPECTIVES GENERALES

Afin de démontrer la véracité de notre hypothèse de départ, certains arguments sont encore à acquérir.

#### 2.1. Validation fonctionnelle *in vitro*

Nous n'avons malheureusement pas pu produire de glucose-acyltransférases fonctionnelles.

La production hétérologue des VvGATs dans un système végétal et leur validation fonctionnelle en optimisant les conditions d'expérimentation reste la perspective la plus urgente afin de pouvoir valider la fonction du gène et son implication dans la galloylation ou l'estérification des acides hydroxycinnamiques. Pour ce faire, l'expression des VvGATs dans les feuilles de tabac comme déjà effectuée pour des protéines d'autres espèces (Weier *et al.*, 2008 ; Mugford *et al.*, 2009) ou dans des hairy- roots de vigne sera entreprise.

#### 2.2. Validation fonctionnelle *in vivo*

La validation fonctionnelle *in vivo* des VvgGTs et des VvGAT va de pair avec les caractérisations *in vitro* des protéines. Des vitroplants de vignes transformés par des agrobactéries contenant le gène anti-sens d'une VvgGT ou d'une VvGAT sont en cours de réalisation. Etant donné le taux d'identité nucléique entre elles, la présence d'un anti-sens *VvgGT* devrait permettre de diminuer l'expression des 3 gènes identifiés. Le cas peut différer pour les *VvGATs*. Il faut également envisager que d'autres gènes dans le génome de la vigne puissent remplir la même fonction et que cette approche soit inefficace pour valider *in vivo* le rôle de ces gènes. La surexpression pourrait également être envisagée. Cependant, un effet potentiel sur le phénotype des plantes transformées repose sur l'hypothèse que l'enzyme dont on surexprime le gène est le facteur limitant du flux métabolique et que ni les substrats, ni les autres enzymes et transporteurs impliqués dans ce caractère ne sont limitants. Ces conditions ne sont pas nécessairement remplies, il y a donc risque d'échec de cette stratégie.

#### 2.3. A la recherche des acteurs manquants

Enfin, la poursuite de ce travail à plus long terme inclura la recherche des acteurs manquants de ces étapes d'estérification de composés phénoliques.

En effet, l'analyse bibliographique du chapitre I nous a montré que le taux de galloylation des PAs pouvait varier d'un génotype à un autre, mais également pour un même cépage, entre les différentes parties de la baie. Il conviendra d'essayer de comprendre quels sont les mécanismes intervenant dans ces régulations fines. Le même type de question peut se poser pour les esters tartriques d'acides hydroxycinnamiques.

D'autre part, nous avons montré qu'une des acyltransférases se trouvait localisée dans des vésicules cytoplasmiques. Un axe de recherche consistera à comprendre comment les substrats potentiels de cette enzyme (à la fois les esters de glucose et les molécules acceptrices d'acyle) sont entrés dans ces vésicules, et comment les produits formés se retrouvent à terme dans les vacuoles. La localisation des glucosyl transférases devrait nous indiquer prochainement si les esters de glucose sont formés dans le hyaloplasme ou dans ces vésicules.

### **3. ENJEUX A LONG TERME DE CE TRAVAIL**

Ce travail de thèse a permis de commencer à établir les mécanismes intervenant dans la synthèse de composés phénoliques acylés du raisin et notamment dans la galloylation des PA.

Ces résultats pourront servir de base pour l'obtention de marqueurs moléculaires précis liés à la composition phénolique du raisin, lors de la création de nouveaux cultivars répondant aux contraintes actuelles de la viticulture (résistance aux pathogènes, adaptation au réchauffement climatique, maintien de la qualité).

Ces résultats pourront également être validés puis utilisés par les communautés travaillant sur d'autres plantes d'intérêt économique telles que le thé, où le taux de galloylation des tanins revêt une importance particulière en terme organoleptique et d'effet potentiel sur la santé.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abrahams S, Lee E, Walker AR, Tanner GJ, Larkin PJ, Ashton AR** (2003) The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant Journal* 35: 624-636
- Abrahams S, Tanner GJ, PJ Larkin, AR Ashton** (2002) Identification and biochemical characterization of mutants in the proanthocyanidin pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* 130: 561–576.
- Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA** (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16: 3098-3109
- Ageorges A, Fernandez L, Violet S, Merdinoglu D, Terrier N, Romieu C** (2006) Four specific isogenes of the anthocyanin metabolic pathway are systematically co-expressed with the red colour of grape berries. *Plant Science* 170: 372-383
- Akagi T, Ikegami A, Suzuki Y, Yoshida J, Yamada M, Sato A, Yonemori K** (2009) Expression balances of structural genes in shikimate and flavonoid biosynthesis cause a difference in proanthocyanidin accumulation in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. *Planta*. 10.1007/s00425-009-0991-6.
- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V** (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* 10: 1135-1149
- Alleweldt G** (1957) Der Einfluß der Photoperiode und Temperatur auf Wachstum und Entwicklung von Holzpflanzen unter besonderer Berücksichtigung der Gattung *Vitis* (Sammelreferat). *Vitis*. 1:159- 180, citée par Fournioux J.C., 1997. Influences foliaires sur le développement végétatif de la vigne. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 31(4):165-183.
- Alleweldt G** (1959) Aufnahme und Weiterleitung des photoperiodischen Reizes bei *Vitis vinifera* L. *Naturwiss.* 46(5):177, citée par Fournioux J.C., 1997. Influences foliaires sur le développement végétatif de la vigne. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 31(4):165-183.
- Alleweldt G** (1963a) Perzeption und Translocation des photoperiodischen Reizes bei *Vitis*. *Angew. Bot.* 37:26-34, citée par Fournioux J.C., (1997) Influences foliaires sur le développement végétatif de la vigne. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 31(4):165-183
- Alleweldt G** (1963b) Die Umweltabhängigkeit des vegetativen Wachstums, der Wachstumsruhe und der Blütenbildung von Reben (*Vitis* species). I. Die photoperiodischen Wachstumsreaktionen. 4(1):11-41, citée par Fournioux J.C., (1997) Influences foliaires sur le développement végétatif de la vigne. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 31(4):165-183
- Alleweldt G** (1964) Die Wirkung des Störlichtes auf die photoperiodische Reaktion der Reben. *Vitis*. 4:357-364 citée par Fournioux J.C., (1997) Influences foliaires sur le développement végétatif de la vigne. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 31(4):165-183.
- Alleweldt G, Engel M, Gebbing H** (1981). Histologische untersuchungen an weinbeeren. *Vitis* 20:1-7.

- Ammerer G, Hunter CP, Rothman JH, Saari GC, Valls LA, Stevens TH** (1986) PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Molecular and cellular biology* 6: 2490 – 2499
- Archetti M** (2000) The origin of autumn colours by coevolution. *Journal of Theoretical Biology* 205: 625-630
- Ardi R, Kobiler I, Jacoby B, Keen NT, Prusky D** (1998) Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53: 269-285
- Aron P, Kennedy J** (2008) Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research* 52(1):79–104.
- Atkinson D** (1973) Some General Effects of Phosphorus Deficiency on Growth and Development. *New Phytologist* 72: 101-111
- Bais AJ, Murphy PJ, Dry I** (2000) The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Plant Physiology* 27: 425–433.
- Baneyx F** (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion of Biotechnology* 10: 411-421.
- Barnavon L, Doco T, Terrier N, Ageorges A, Romieu C, Pellerin P** (2000) Analysis of cell wall neutral sugar composition,  $\beta$ -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38: 289-300.
- Barrell BG and Rajandream MA** (1994) *S.cerevisiae* chromosome XIII cosmid 8175.
- Bate-Smith EC** (1954) Astringency in foods. *Food* 23: 419-429.
- Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L** (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant* 39:366-380.
- Baulcombe DC, Barker RF, Jarvis MG** (1987) A gibberellin responsive wheat gene has homology to yeast carboxypeptidase Y. *Journal of Biology Chemistry* 262: 13726–13735
- Baur PS, Walicingshaw CH** (1974) Fine structure of tannin accumulation in callus cultures of *Pinus elliottii* (slash pine). *Canadian Journal of Botany* 52: 615-619.
- Bavaresco L, Fregoni C** (2001) Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds. In: Roubelakis- Angelakis KA (Ed.): *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*, 153-182.
- Baxter IR, Young JC, Armstrong G, Foster N, Bogenschutz N, Cordova T, Peer WA, Hazen SP, Murphy AS, Harper JF** (2005) A plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 2649-2654
- Bayer A, Ma XY, Stockigt J** (2004) Acetyltransfer in natural product biosynthesis functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase, *Bioorg Med Chem* 12: 2787–2795.

- Bech LM, Breddam K** (1989) Inactivation of carboxypeptidase Y by mutational removal of the putative essential histidyl residue. *Carlsberg Res Commun* 54: 165–171
- Beck SD and Schoonhoven LM** (1980) Insect behavior and plant resistance. In: Maxwell FG and Jennings PR, Editors, *Breeding Plants Resistant to Insects*, Wiley, New York pp. 115–136.
- Bertolini A, Peresson C, Petrusa E, Braidot E, Passamonti S, Macri F, Vianello A** (2009) Identification and localization of the bilitranslocase homologue in white grape berries (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Experimental Botany* 225
- Beyer TA, Sadler JE, Rearick JI, Paulson JC, Hill RL** (1981) Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure- function relationships. *Advances in Enzymol.* 52:23-175.
- Bindon KA, Smith PA, Kennedy JA** (2010) Interaction between grape-derived proanthocyanidins and insoluble cell wall polysaccharides I. Effect on proanthocyanidin composition and molecular mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2520-2528.
- Birnboim HC and Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids* 933-951
- Bishop PD and Nagel CW** (1984) Characterization of the condensation product of malvidin 3,5-diglucoside and catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 1022–1026.
- Blaudeck N, Sprenger GA, Freudl R, Wiegert T** (2001) Specificity of signal peptide recognition in tat-dependent bacterial protein translocation. *The journal of Bacteriology* 183: 604–610
- Blount JW, Korth KL, Masoud SA, Rasmussen S, Lamb C, Dixon RA** (2000) Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* 122: 107-116.
- Boeck R, Kolakofsky D** (1994) Positions +5 and +6 can be major determinants of the efficiency of non-AUG initiation codons for protein synthesis. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 13:3608–3617
- Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP** (2005) Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology* 139: 652-663
- Bogs J, Ebadi A, McDavid D, Robinson SP** (2006) Identification of the Flavonoid Hydroxylases from Grapevine and Their Regulation during Fruit Development. *Plant Physiology* 140:279-291
- Bogs J, Jaffe FW, Takos AM, Walker AR, Robinson SP** (2007) The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiology* 143: 1347–1361
- Bolwell GP, Bozak K, Zimmerlin A** (1994) Plant Cytochrome-P450. *Phytochemistry* 37: 1491-1506
- Booij-James IS, Dube SK, Jansen MAK, Edelman M, Matoo AK** (2000) Ultraviolet-B radiation in plants: turnover of the PSII reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism. *Plant Physiology*

- Boss PK, Davies C, Robinson SP** (1996) Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2: 163-170
- Boss PK, Davies C, Robinson SP** (1996a) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology* 111: 1059-1066
- Boss PK, Davies C, Robinson SP** (1996b) Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology* 32: 565-569.
- Boukharta M, Girardi M, Metche M** (1988) Procyanidines galloylées du sarment de vigne (*Vitis vinifera*). Séparation et identification par chromatographie liquide haute performance and chromatographie en phase gazeuse. *Journal of Chromatography* 455 : 406-409
- Boursiquot JM, Sapis JC, Macheix JJ** (1986) Les esters hydroxycinnamiques chez le genre *Vitis*. Essai d'application taxonomique: premiers résultats. *Comptes Rendus Academie des Sciences* 302 : 177.
- Bowles D, Isayenkova J, Lim EK, Poppenberger B** (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Plant Biology* 8: 254–63
- Bowles D, Lim EK, Poppenberger B, Vaistij FE** (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annual Review of Plant Biology* 57: 567-97.
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Braidot E, Petrusa E, Bertolini A, Peresson C, Ermacora P, Loi N, Terdoslavich M, Passamonti S, Macri F, Vianello A** (2008) Evidence for a putative flavonoid translocator similar to mammalian bilitranslocase in grape berries (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Planta* 228: 203-213
- Brazier-Hicks M, Offen WA, Gershater MC, Revett TJ, Lim EK, Bowles DJ, Davies GJ, Edwards R.** (2007) Characterization and engineering of the bifunctional N- and O-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* 104, 20238-20243.
- Breddam K, Soerensen SB, Svendsen I** (1987) Primary structure and enzymatic properties of carboxypeptidase II from wheat bran. *Carlsberg Research Communication* 52: 297-311
- Brenner C and Fuller RS** (1992) Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 922–926.
- Brouillard R** (1993) *The Flavonoids, Advances in research since 1986.* Ed J. B. Harborne. Chapman and Hall, London
- Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA** (1999) The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular Microbiology* 31: 394-395

- Burbulis IE, Winkel-Shirley B** (1999) Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 12929-12934
- Cadot Y, Minana-Castello MT, Chevalier M** (2006) Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet franc during fruit development. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 9206–9215.
- Calderon AA, Pedreno MA, Munoz R, Ros Barcelo A** (1993) Evidence for the non-vacuolar localization of anthocyanoplasts (anthocyanin-containing vesicles) in suspension cultured grapevine cells. Phyton 54 : 91-98.
- Canon F, Meudec E, Marlin T, Sarni-Manchado P, Cheynier V** (2008). Basic salivary proline rich proteins involved in astringency studied by mass spectrometry. In: 8<sup>th</sup> European Symposium on Saliva (p. 33).
- Carbonneau A, Deloire A, Jaillard B** (2007) La vigne Physiologie, terroir, culture. Ed 1 Vol 1. Dunod, Paris
- Carmona MJ, Chaïb J, Martinez-Zapater JM, Thomas MR** (2008) A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. Journal of Experimental Botany 59: 2579-2596
- Cassagne C, Lessire R, Bessoule JJ, Moreau P, Creach A, Schneider F** (1994) Biosynthesis of very long chain fatty acids in higher plants. Progress in Lipid Research 33: 22-69.
- Cercos C, Urbez, Carbonell J** (2003) A serine carboxypeptidase gene (PsCP), expressed in early steps of reproductive and vegetative development in *Pisum sativum*, is induced by gibberellins, Plant of Molecular Biology 51: 165–174
- Chafe SC, Durzan DJ** (1973) Tannin inclusions in cell suspension cultures of white spruce, Planta 113: 251-262.
- Champagnol F** (1984) Eléments de physiologie de la vigne et viticulture générale. Champagnol F., Saint-Gely-du-Fesc, France. 352pp.
- Chapple CC, Vogt T, Ellis BE, Somerville CR** (1992) An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. Plant Cell. 4:1413-1424.
- Chatonnet P, Dubourdieu D, Boidron JN, Lavigne V** (1993) Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in Wines. Journal of Science Food and Agriculture. 62: 191-202.
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan JP, Latché A, Lamon J, Bouzayen M** (2004) Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. Plant Science 167: 1301-1305.
- Chesson A, Gardner PT, Wood TJ** (1997) Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. Journal of the Science of Food and Agriculture 75: 289- 295.
- Cheynier V, Duenas-Paton M, Salas E, Maury C, Souquet JM, Sarni-Manchado P, Fulcrand H** (2006) Structure and properties of wine pigments and tannins. American Journal of Enology and Viticulture 57: 298-305

- Cheyrier V, Fulcrand H, Sarni P, Moutounet M** (1998) Progress in Phenolic Chemistry in the Last Ten Years. Proceedings of the Australian Society of Viticulture and Oenology Seminar – Phenolics and Extraction, Adelaide, Winetitles, Adelaide 12-17.
- Cheyrier V, Rigaud J** (1986) HPLC Separation and Characterization of Flavonols in the Skins of *Vitis-Vinifera* Var Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 248-252
- Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V** (1994) Impact of Low-Temperature Stress on General Phenylpropanoid and Anthocyanin Pathways - Enhancement of Transcript Abundance and Anthocyanin Pigmentation in Maize Seedlings. *Planta* 194: 541-549
- Close DC, Davies NW, Beadle CL** (2001) Temporal variation of tannins (galloylglucoses), flavonols and anthocyanins in leaves of *Eucalyptus nitens* seedlings: implications for light attenuation and antioxidant activities. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 269-278
- Coleman JOD, Randall R, BlakeKalff MMA** (1997) Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: A fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant Cell and Environment* 20: 449-460
- Coley P, Bryant J, Chapin F** (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. – *Science* 230: 895–899.
- Conde C, Silva P, Fontes N, Dias ACP, Tavares RM, Sousa MJ, Agasse A, Delrot S, Geros H** (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1: 1-22
- Conn S, Curtin C, Bezier A, Franco C, Zhang W** (2008) Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *Journal of Experimental Botany*. 59: 3621-3634
- Conn S, Zhang W, Franco C** (2003) Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension cultured grapevine cells. *Biological Letters* 25: 835-839.
- Cooley HS, Robinson HS, Wielgus RB, Lambert CD** (2008) Cougar prey selection in a white-tailed deer and mule deer community. *Journal of Wildlife Management Journal de la gestion de la faune* 72:99–106
- Coombe BG** (1973) The regulation of set and development of the grape berry. *Acta Horticulturae*: 261-273
- Coombe BG** (1976) Development of Fleshy Fruits. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 27: 207-228
- Coombe BG** (1987) Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *American Journal of Enology and Viticulture* 38: 127-127
- Coombe BG and McCarthy MG** (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 131-135

- Cortell JM, Kennedy JA** (2006) Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot noir fruit and extraction in a model system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8510-8520.
- Costa- Arbulu C, Ganoli E, Gonzalez WL, Niemeyer HM** (2001) Feeding by the aphid *Sipha flava* produces a reddish spot on leaves of *Sorghum halepense*: An induced response? *Journal of Chemical Ecology* 27: 271–281.
- Cravero MC, Guidoni S, Schneider A, Distefano R** (1994) Morphological and Biochemical-Characterization of Colored Berry-Muscat Grapevine Cultivars. *Vitis* 33: 75-80
- Cutanda-Perez MC, Ageorges A, Gomez C, Violet S, Terrier N, Romieu C, Torregrosa L** (2008) Ectopic expression of *VlmybA1* in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant Molecular Biology* 69: 633-648
- Cutanda-Perez MC, Ageorges A, Gomez C, Violet S, Terrier N, Romieu C, Torregrosa L** (2009). Ectopic expression of *VlmybA1* in grapevine activates a narrow set of genes involved in anthocyanin synthesis and transport. *Plant Molecular Biology* 2009 69:633-648.
- Czochanska Z, Foo LY, Newman RH, Porter LJ, Thomas WA** (1979) Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 375- 377
- D’Auria JC, Pichersky E, Schaub A, Hansel A, Gershenzon J** (2007a) Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (*Z*)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 49: 194–207.
- D’Auria JC, Reichelt M, Luck K, Svatos A, Gershenzon J** (2007b) Identification and characterization of the BAHD acyltransferase malonyl CoA: anthocyanidin 5-O-glucoside-6 $\alpha$ ’-Omalonyltransferase (*At5MAT*) in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 581: 872–878.
- Da Silva Porto, PA, Laranjinha JA, De Freitas VA** (2003) Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 66: 947-954.
- Dahlbender B, Strack D.** (1986) Purification and properties of 1-(hydroxycinnamoyl)-glucose:1-(hydroxycinnamoyl)-glucose hydroxycinnamoyltransferase from radish seedlings. *Phytochemistry* 25: 1043-1046.
- DaSilva LLP, Foresti O, Deneckel J** (2006). Targeting of the plant vacuolar sorting receptor BP80 is dependent on multiple sorting signals in the cytosolic tail. *Plant Cell* 10: 1477-1497.
- D’Auria JC** (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 331-340
- Davies KM, Schwinn KE** (2006) Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. In: Anderson OM and Markham KR (Eds) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications* 143–218
- Dean JV and Delaney SP** (2008) Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 132: 417–425

- Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T** (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, 221, 287–296.
- Debeaujon I, Peeters AJM, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M** (2001) The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* 13: 853-871
- Degan FD, Rocher A, Cameron-Mills V, von Wettstein D** (1994) The expression of serine carboxypeptidases during maturation and germination of barley grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 8209–8213
- Delcour JA, Ferreira D, Roux DG** (1983) Synthesis of condensed tannins. Part 9. The condensation sequence of leucocyanidin with (+)-catechin and with the resultant procyanidins. *Journal of the Chemical Society* 1: 1711–1717.
- Delgado R, Martin P, Del Alamo M, Gonzalez MR** (2004) Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 623-630.
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde JP, Merillon JM, Hamdi S** (2006) Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* 140: 499-511
- Deluc L, Bogs J, Walker AR, Ferrier T, Decendit A, Merillon J-M, Robinson SP, Barrieu F** (2008) The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiol* 147: 2041-2053
- Diakou P, Carde JP** (2001) In situ fixation of grape berries. *Protoplasma* 218: 225-235
- Dixon RA, Xie DY, Sharma SB** (2005) Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* 165: 9-28
- Do CB, Cormier F, Nicolas Y** (1995) Isolation and characterization of a UDP-glucose:cyanidin 3-glucosyltransferase from grape cell suspension cultures (*Vitis vinifera* L.). *Plant Science*. 112: 43-51.
- Doan NP and Fincher GB** (1988) The A- and B-chains of carboxypeptidase I from germinated barley originate from a single precursor polypeptide. *Journal of Biology Chemistry* 263: 11106–11110
- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP** (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* 57:257-268.
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP** (2003a) Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9: 110-121
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP** (2003b) Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9: 15-27.

- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP** (2004) The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 55-73.
- Dubois PJ** (1983) Volatile phenols in wine. In: *Flavour of distilled beverages* (piggott J.R., Ed.), Soc. Chel. Ind. London, 110-119.
- Dubos C, Le Gourrierec J, Baudry A, Huet G, Lanet E, Debeaujon I, Routaboul JM, Alboresi A, Weisshaar B, Lepiniec L** (2008) MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 55: 940-953
- Dudareva N, D'Auria JC, Nam KH, Raguso RA, Pichersky E** (1998a) Acetyl CoA:benzylalcohol acetyltransferase: an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant Journal* 14:297–304.
- Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE** (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiology* 144: 197-205
- Ebel J and Hahlbrock K** (1982) In Harborne JB and Mabry TJ (eds.) *Advances in Flavonoid Research 1975-1980*. Chapman and Hall, London, pp. 641-679.
- El Kereamy A, Chervin C, Roustan J.P, Cheynier V, Souquet J.M, Moutounet M, Raynal J, Ford C.M, Latche A, Pech J.C, Bouzayen M** (2003) Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Plant physiology* 119: 175-182.
- Endrizzi JA, Breddam K, Remington SJ** (1994) 2.8-A structure of yeast serine carboxypeptidase. *Biochemistry* 33: 11106–11120
- Erhart E, Hollenberg CP** (1983) The Presence of a Defective LEU2 Gene in 2 $\mu$  DNA Recombinant Plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is Responsible for Curing and High Copy Number. *Journal of Bacteriology* 156: 625-635.
- Escribano-Bailon MT, Guerra MT, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C** (1995) Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 200: 221–224.
- Etievant PX** (1981) Volatile phenol determination in wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29 : 65–67
- Eudes A, Bozzo GG, Waller JC, Naponelli V, Lim EK, Bowles DJ, Gregory JF and Hanson AD** (2008). Metabolism of the Folate Precursor p-aminobenzoate in Plants: Glucose Ester Formation and Vacuolar Storage. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 15451-15459.
- Faegri K, Van der Pijl L** (1971) *The principles of pollination ecology*. 2nd rev. Ed. Pergamon Press, New York, NY. 291 pp.
- Felle HH** (2005) pH regulation in anoxic plants. *Annals of Botany* 96: 519–532.
- Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S** (1999) Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiology* 120: 1083–1093.

- Fong RA, Kepner RE, Webb AD** (1971) Acetic-acid-acylated anthocyanin pigments in the grape skins of a number of varieties of *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture*: 22 150-155
- Ford CM, Boss PK, HOJ PB (1998)** Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose: Flavonoid 3-O-glycosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize bronze-1 locus which may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo. *Journal of Biology Chemistry* 273: 9224-9233.
- Forkmann G, Heller W, Grisebach H** (1980) Anthocyanin Biosynthesis in Flowers of *Matthiola-Incana* Flavanone-3-Hydroxylase and Flavonoid-3'-Hydroxylase. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 35: 691-695
- Fougère-Rifot M, Cholet C, Bouard J** (1996) Evolution des parois des cellules de l'hypoderme de la baie de raisin lors de leur transformation en cellules de pulpe. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 30 : 47-51.
- Fournand D, Vicens A, Sidhoum L, Souquet JM, Moutounet M, Cheynier V** (2006) Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7331-7338
- Frangne N, Eggmann T, Koblischke C, Weissenbock G, Martinoia E, Klein M** (2002) Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and arabidopsis cell culture vacuoles. Energization occurs by H<sup>+</sup>-antiport and ATP-binding cassette-type mechanisms. *Plant Physiology* 128: 726-733
- Fraser, CM, Thompson MG, Shirley AM, Ralph J, Schoenherr JA, Sinlapadech T, Hall MC, Chapple C** (2007) Related *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like sinapoylglucose acyltransferases display distinct but overlapping substrate specificities. *Plant Physiology* 144:1986– 1999
- Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, Berge O, Heulin T** (1997). Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied Environmental Microbiology*, 63: 1852-1860.
- Froemel S, Devlaming P, Stotz G, Wiering H, Forkmann G, Schram AW** (1985) Genetic and Biochemical-Studies on the Conversion of Flavanones to Dihydroflavonols in Flowers of *Petunia-Hybrida*. *Theoretical and Applied Genetics* 70: 561-568
- Frohlich B, Niemetz R, Gross GG** (2002) Gallotannin biosynthesis: Two new galloyltransferases from *Rhus typhina* leaves preferentially acylating hexa- and heptagalloylglucoses. *Planta*, 216: 168-172.
- Frydman A, Weisshaus O, Bar-Peled M, Huhman DV, Sumner LW, Marin FR** (2004) Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene *Cm1, 2RhaT* encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *Plant Journal* 40:88-100.
- Fujita A, Goto-Yamamoto N, Aramaki I, Hashizume K** (2006) Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of Grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in Grape berry skins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70(3): 632-638

- Fujiwara H, Tanaka Y, Fukui Y, Ashikari T, Yamaguchi M, Kusumi T** (1998) Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Science* 137: 87-94.
- Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K, Ma JF** (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant and Cell Physiology* 48: 1081-1091
- Gachon C, Langlois-Meurinne M, Henry Y, Saindrenan P** (2005) Transcriptional co-regulation of secondary metabolism enzymes in *Arabidopsis* : functional and evolutionary implications. *Plant Molecular Biology* 58: 229-245
- Gachon C, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P** (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases genes : the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* 10: 542-549
- Gagné S, Saucier C, Gény L** (2006) Composition and cellular localization of tannins in Cabernet sauvignon skins during growth. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 9465-9471.
- Galet P** (2000) Dictionnaire encyclopédique des cépages, Hachette
- Galet P** (2000) Précis de viticulture, JF impression, Saint Jean de Vedas
- Gao P, Li X, Cui D, Wu L, Parkin I, Gruber MY** (2010) A new dominant *Arabidopsis* transparent testa mutant, *sk21-D*, and modulation of seed flavonoid biosynthesis by *KAN4*. *Plant Biotechnology journal* 8: 979-93.
- Gargouri M, Chaudière J, Manigand C, Maugé C, Bathany K, Schmitter JM, Gallois B** (2010) The epimerase activity of anthocyanidin reductase from *Vitis vinifera* and its regiospecific hydride transfers. *The Journal of Biological Chemistry*
- Gary C, Brisson N, Gaudillere JP, Duarte M** (2003) Modélisation d'une espèce ligneuse pérenne à fruits charnus: la vigne. Séminaire STICS, Arles (janvier 2003) 36-37
- Gatto P, Vrhovsek U, Muth J** (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11773–11785
- Gény L, Broquedis M, Martin-Tanguy J, Bouard J** (1997) Free, conjugated and wall bound polyamines on various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* 48 (1): 80-84
- Geraudie V** (2009) Système d'aide à la conduite des procédés viticoles et œnologiques, basé sur l'utilisation d'un capteur piéton de suivi de maturité pp. 3-4
- Gerats AGM, Bussard J, Coe EH, Larson R** (1984) Influence of B and PI on UDPG : flavonoid-3-O-glucosyltransferase in *Zea mays*. *Biochemical, Genetics journal* 22: 1161-1169
- Glässgen WE, Seitz HU** (1992) Acylation of anthocyanins with hydroxycinnamic acids via 1-O-acylglucosides by protein preparations from cell cultures of *Daucus carota* L. *Planta* 186: 582–585

- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG** (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274 : 563 -567 .
- Gollop R, Even S, Colova-Tsolova V, Perl A** (2002) Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *Journal of Experimental Botany* 53: 1397-1409
- Gomez C, Conejero G, Torregrosa L, Cheynier V, Terrier N, Ageorges A** (2011) In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *Plant Journal*
- Gomez C, Terrier N, Torregrosa L, Vialet S, Fournier-Level A, Verries C, Souquet JM, Mazauric JP, Klein M, Cheynier V, Ageorges A** (2009) Grapevine MATE-Type Proteins Act as Vacuolar H<sup>+</sup>-Dependent Acylated Anthocyanin Transporters. *Plant Physiology* 150: 402-415
- Goodman CD, Casati P, Walbot V** (2004) A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* 16: 1812-1826
- Goto- Yamamoto N, Wang GH, Masaki K, Kobayashi S** (2002) Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Science* 162: 867-872.
- Gould KS and Lister C** (2006) Flavonoid functions in plants, p. 397-441. In Andersen OM and Markham KR (ed.), *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL.
- Granat SJ, Wilson KA, Wilson AL** (2003) New serine carboxypeptidase in mung bean seedling cotyledons. *Journal of Plant Physiology* 160:1263–1266
- Grawe W, Bachhuber P, Mock HP, Strack D** (1992) Purification and Characterization of Sinapoylglucose - Malate Sinapoyltransferase from *Raphanus-Sativus* L. *Planta* 187: 236-241
- Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M** (2009) A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant Journal* 58: 246–259.
- Gross GG** (1983) Synthesis of mono-, di- and trigalloyl-  $\beta$ -D-glucose by b-glucogallin-dependent galloyltransferases from oak leaves. *Z Naturforsch* 38: 519–523
- Grotewold E** (2004) The challenges of moving chemicals within and out of cells: insights into the transport of plant natural products. *Planta* 219:906-909.
- Grotewold E** (2006) *The Science of Flavonoids*. Springer p. 269
- Grotewold E** (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology* 57: 761–780
- Grotewold E, Davies K** (2008) Trafficking and sequestration of anthocyanins. *Natural Product Communications* 3: 1251-1258
- Guyot S, Cheynier V, Vercauteren J** (1996) Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *phytochemistry*, 42:1279-1288.

- Halkier BA, Gershenzon J** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* 57: 303–333
- Hall D and De Luca V** (2007) Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (*Vitis labrusca*). *The Plant Journal* 49: 579–591
- Harborne JB, Baxter H** (1999) The Handbook of Natural Flavonoids. In JB Harborne, H Baxter, eds, *The Handbook of Natural Flavonoids*, Vol 2. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany
- Harborne JB, Williams CA** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481–504
- Harborne JB, Williams CA** (2001) Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports* 18: 310–333
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA** (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* 10: 1788–1795
- Haslam E** (1974). Polyphenol-protein interactions. *Biochemical Journal*, 139, 285–288.
- Hause B, Meyer K, Viitanen PV, Chapple C, Strack D** (2002) Immunolocalization of 1-O-sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215: 26–32.
- Hayashi R, Bai Y, Hata T** (1975) Evidence for an essential histidine in carboxypeptidase Y. Reaction with the chloromethyl ketone derivative of benzyloxycarbonyl-L-phenylalanine. *Journal of Biology Chemistry* 250: 5221–5226
- Hayashi R, Moore S, Stein WH** (1973) Serine at the active center of yeast carboxypeptidase. *Journal of Biology Chemistry* 248: 8366–8369
- Hayes MA, Davies C, Dry IB** (2007) Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *Journal of Experimental Botany* 58: 1985–1997
- He X, Turner C, Chen GQ, Lin JT, McKeon TA** (2004) Cloning and Characterization of a cDNA Encoding Diacylglycerol Acyltransferase from Castor Bean. *Lipids* 39: 311–318.
- He XP, Guo XN, Zhang BR, Tan HR** (2004) Effect of overexpression of sterol-acyl transferase on ergosterol production in yeast strains. *Acta Microbiol* 44:67–71
- Hedrich R, Kurkdjian A, Guern J, Flugge UI** (1989) Comparative Studies on the Electrical-Properties of the H<sup>+</sup> Translocating Atpase and Pyrophosphatase of the Vacuolar-Lysosomal Compartment. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 8: 2835–2841
- Heller W, Forkmann G** (1988) Biosynthesis. Advances in research since 1980. In: Harborne JB (ed) *The flavonoids*. Chapman and Hall, London 399 - 425
- Hemingway RW and McGraw GW** (1983) Kinetics of acid-catalyzed cleavage of procyanidins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 3:421–425.
- Hensing MC, Rouwenhorst RJ, Heijnen JJ, van Dijken JP, Pronk JT** (1995) Physiological and technological aspects of large-scale heterologous protein production with yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67:261–279.

- Hichri I, Heppel SC, Pillet J, Leon C, Czempl S, Delrot S, Lauvergeat V, Bogs J** (2010) The basic helix–loop–helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. *Molecular Plant* 3: 509–523.
- Hipskind J, Wood K, Nicholson RL** (1996) Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to *Bipolaris maydis* race O. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 247-256
- Hiratsuka S, Onodera H, Kawai Y, Kubo T, Itoh H, Wada R** (2001a) ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured in vitro. *Scientia Horticulturae* 90: 121-130.
- Hochstrasser U, Lüscher M, DeVirgilio C, Boller T, Wiemken A** (1998) Expression of a functional barley sucrose-fructan 6-fructosyltransferase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Letters* 440: 356-360
- Hodges DM, Nozzolillo C** (1996) Anthocyanin and anthocyanoplast content of cruciferous seedlings subjected to mineral nutrient deficiencies. *Journal of Plant Physiology* 147: 749-754
- Holton TA, Cornish EC** (1995) Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083
- Hopp W, Seitz HU** (1987) The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*. *Planta* 170: 74-85
- Hosel W** (1981) Glycosylation and Glycosidases. In EE COM ed, *The Biochemistry of Plants*. Vol 7, Academic Press, New York, pp 725-753
- Hrazdina G, Jensen RA** (1992) Spatial-Organization of Enzymes in Plant Metabolic pathways. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 241-267
- Hrazdina G, Parsons GF, Mattick LR** (1984) Physiological and Biochemical Events During Development and Maturation of Grape Berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 35: 220-227
- Hsieh K, Huang AHC** (2005) Lipid-rich tapetosomes in Brassica tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum. *Plant Journal* 43: 889-899
- Hsieh K, Huang AHC** (2007) Tapetosomes in Brassica tapetum accumulate endoplasmic reticulum-derived flavonoids and alkanes for delivery to the pollen surface. *Plant Cell* 19: 582- 596
- Huglin P, Schneider C** (1998) *Biologie et écologie de la vigne*. Lavoisier, Paris 370pp.
- Hugueney P, Provenzano S, Verries C, Ferrandino A, Meudec E, Batelli G, Merdinoglu D, Cheynier V, Schubert A, Ageorges A** (2009) A novel cation-dependent O-methyltransferase involved in anthocyanin methylation in grapevine. *Plant Physiology*
- Iiyama K, Lam TBT, Stone BA** (1990) Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* 29: 733-737.
- Iiyama K, Lam TB-T, Stone BA** (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology* 104: 315–320

- Ikan R.** (1999) Naturally Occurring Glycosides. Ikan R, ed. Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Ikegami A, Eguchi S, Kitajima A, Inoue K, Yonemori K** (2007) Identification of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. *Plant Science* 172:1037–1047
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A** (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* 153, 163-168.
- Jackson RG, Lim EK, Li Y, Kowalczyk M, Sandberg G** (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* 276:4350–56
- Jacques D and Haslam E** (1974) Plant proanthocyanidins I. I-Proanthocyanidin-Aa<sub>2n</sub> and its derivatives. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions* 1:2663-2671
- Jaillon O, Aury JM, Noël B** (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-7.
- Jansen J, Woker J, Kula, M-R** (1992) Purification and protein characterisation of hydroxynitrile lyases from sorghum and almond. *Biotechnol Appl Biochem* 15: 90-99
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M** (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50:2731-2734.
- Jende-Strid B** (1991) Gene-enzyme relations in the pathway of flavonoid biosynthesis in barley. Theoretical and applied. *Genetics* 81:668–674
- Jensen ON, Wilm M, Shevchenko A, Mann M** (1999) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2D-gels. *Molecular Biology* 112: 513–530.
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M** (2006) Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Science* 170: 61- 69
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M** (2008) Expression of multi-copy flavonoid pathway genes coincides with anthocyanin, flavonol and flavan-3-ol accumulation of grapevine. *Vitis* 47: 135-140
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M** (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167: 247-252
- Jin H, Cominelli E, Bailey P, Parr A, Mehrstens F, Jones J, Tonelli C, Weisshaar B, Martine C** (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 control production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 19(22): 6150-6161
- Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR** (2002) TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14: 1359-1375

- Jones CG, Lycett GW, Tucker GA** (1996) Protease inhibitor studies and cloning of a serine carboxypeptidase cDNA from germinating seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *European Journal of Biochemistry* 235: 574–578
- Jones P, Messner B, Nakajima JI, Schaffner AR, Saito K** (2003) UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 43910–43918
- Jones P, Vogt T** (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213:164–74
- Jonsson LMV, Aarsman MEG, Van Dlepen J, De Vlaming P, Smit N, Schram AW** (1984). Properties and genetic control of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in flowers of *Petunia hybrida*. *Planta* 160, 341-347.
- Jonsson LMV, Aarsman MEG, Bastiaannet J, Donker-Koopman WE, Gerats AGM, Schram AW** (1984) *Z. Naturforsch* 39: 559–564.
- Kajiya K, Kumazawa S, Nakayama T** (2001) Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65: 2638-2643.
- Kajiya K, Kumazawa S, Nakayama T** (2002) Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66: 2330-2335.
- Karimi M, Inze D, Depicker A** (2002) GATEWAY(TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7: 193-195
- Kasuga J, Hashidoko Y, Nishioka A, Yoshiba M, Arakawa K, Fujikawa S** (2008) Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant Cell and Environment* 31: 1335-1348
- Kaur C, Kapoor HC** (2001) Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *Int. Journal of Food Science and Technology* 36: 703–725
- Kennedy JA, Hayasaka Y, Vidal S, Waters EJ, Jones GP** (2001) Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5348-5355
- Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL** (2000a) Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Journal of Phytochemistry* 55: 77-85
- Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL** (2002) Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 268-274
- Kennedy JA, Troup GJ, Pilbrow JR, Hutton DR, Hewitt D, Hunter CR, Ristic R, Iland PG, Jones GP** (2000) Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian journal of Grape and Wine Research* 6: 244-254
- Kita M, Hirata Y, Morlguchi T, Endo-Inagaki T, Matsumoto R, Hasegawa S, Suhayda CG, Omura M** (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in *Citrus*. *FEBS Letters* 469: 173 - 178.

- Kitamura S** (2006) Transport of flavonoids: from cytosolic synthesis to vacuolar accumulation. In: Grotewold E, editor. Science of flavonoids. Berlin, Germany: Springer 123-146.
- Kitamura S, Matsuda F, Tohge T, Yonekura-Sakakibara K, Yamazaki M, Saito K, Narumi I** (2010). Metabolic profiling and cytological analysis of proanthocyanidins in immature seeds of *Arabidopsis thaliana* flavonoid accumulation mutants. Plant Journal 62: 549–559.
- Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A** (2004) TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. Plant Journal 37: 104- 114
- Klein M, Weissenböck G, Dufaud A, Gaillard C, Kreuz K, Martinoia E** (1996) Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside. Journal of Biological Chemistry 271: 29666-29671
- Klick S, Herrmann K** (1988) Glucosides and Glucose Esters of Hydroxybenzoic Acids in Plants, Phytochemistry 27: 2177-2180.
- Kliewer WM** (1966) Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. Plant Physiology 41: 923-931
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N, Hirochika H** (2004) Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. Science 304: 982
- Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, Honda C** (2002) Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. Planta 215: 924–933
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F** (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. Trends Plant Science 10:236-242.
- Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM** (1994) The Flavonoid Biosynthetic-Pathway in Plants - Function and Evolution. Bioessays 16: 123-132
- Kong JM, Chia LS, Goh NK** (2003) Analysis and biological activities of anthocyanidins. Phytochemistry 64: 923-33
- Koornneef M** (1981) The complex syndrome of ttg mutants. Arabidopsis Information Service 18:45-51.
- Koornneef M** (1990) Mutations affecting the testa colour in Arabidopsis. Arabidopsis. Information Service 27 : 1-4
- Koukol J, Connee EE** (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. The Journal of Biological Chemistry (Baltimore) 236 : 2692-2698.
- Koundouras S, Marinos V, Gkoulioti A, Kotseridis Y, Van Leeuwen C** (2007) Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 5077-5086.
- Krol M, Gray GR, Hurry VM, Oquist G, Malek L, Huner NPA** (1995) Low-Temperature Stress and Photoperiod Affect an Increased Tolerance to Photoinhibition in *Pinus-Banksiana* Seedlings. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 73: 1119-1127

- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004)** MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150–163
- Kumar V, Sharma SS (1999)** Nutrient deficiency-dependent anthocyanin development in *Spirodela polyrhiza* L-Schleid. *Biologia Plantarum* 42: 621–624
- Kurjan J (1985)**  $\alpha$ -Factor structural gene mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: Effects on  $\alpha$ -factor production and mating. *Molecular and Cellular Biology* 5: 787–796.
- Kurjan J and Herskowitz I (1982)** Structure of a yeast pheromone gene (MF $\alpha$ ): A putative  $\alpha$ -factor precursor contains four tandem copies of mature  $\alpha$ -factor. *Cell* 30: 933–943
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Landry LG, Chapple CCS, Last RL (1995)** Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology* 109: 1159–1166
- Langcake P (1981)** Disease resistance of *Vitis* sp. and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin,  $\alpha$ -viniferin and pterostilbene. *Physiol Plant Pathol* 18: 213–226
- Larson RL (1971)** Glucosylation of quercetin by a maize pollen enzyme. *Phytochemistry* 10: 3073–3076
- Lee H, Raskin I (1999)** Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *Journal of Biological Chemistry* 274: 36637–36642.
- Lee HI, Leon J, Raskin I (1995)** Biosynthesis and metabolism of salicylic acid . *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 4076–4079
- Lee JH and Talcott ST (2004)** Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. *Journal of Agriculture and Food Chem.* 52: 361–366.
- Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano JC, Viitanen PV, Strack D, Chapple C (2000)** Cloning of the SNG1 gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* 12:1295–1306
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M (2006)** Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 405–430
- Li AX, Steffens JC (2000)** An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglycerol is a serine carboxypeptidase-like protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:6902–6907
- Li AX, Steffens JC (2000)** An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglycerol is a serine carboxypeptidase-like protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 6902–6907
- Li Y, Baldauf S, Lim EK, Bowles DJ (2001)** Phylogenetic analysis of the UDP- glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 276:4338–4343

- Liao D, Breddam K, Sweet RM, Bullock T, Remington SJ** (1992) Refined atomic model of wheat serine carboxypeptidase II at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 31: 9796–9812
- Liao D, Remington SJ** (1990) Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase. *Journal of Biological Chemistry* 265: 6528–6531
- Licker JL, Acree TE, Henick-Kling T** (1999) What is 'Brett' (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation. *American Chemical Society Symposium Series* 714: 96-115.
- Lim E, Li Y, Parr A, Jackson R, Ashford DA, Bowles DJ** (2001) Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 4344–4349.
- Lim EK, Baldauf S, Li Y, Elias L, Worrall D, Spencer SP, Jackson RG, Taguchi G, Ross J, Bowles DJ** (2003a) Evolution of substrate recognition across a multigene family of glycosyltransferases in *Arabidopsis*. *Glycobiology* 13: 139–145
- Lim EK, Bowles DJ** (2004) A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 23: 2915–2922
- Lim EK, Doucet CJ, Hou B, Jackson RG, Abrams SR, Bowles DJ** (2005a) Resolution of (+)-abscisic acid using an *Arabidopsis* glycosyltransferase. *Tetrahedron: Asymmetry* 16: 143–147
- Lim EK, Doucet CJ, Li Y, Elias L, Worrall D** (2002) The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *Journal of Biological Chemistry* 277:586–92
- Lim EK, Jackson RG, Bowles DJ** (2005b) Identification and characterization of *Arabidopsis* glycosyltransferases capable of glucosylating coniferyl aldehyde and sinapyl aldehyde. *FEBS Letters* 579: 2802–2806
- Lindoo SJ and Caldwell MM** (1978) Ultraviolet-B radiation-induced inhibition of leaf expansion and promotion of anthocyanin production. *Plant Physiology* 61:278–282.
- Lipka V, Kwon C, Panstruga R** (2007) SNARE-Ware: The Role of SNARE-Domain Proteins in Plant Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23: 147–174.
- Liu H, Wang X, Zhang Y, Yang Y, Ge X, Song F** (2008) A rice serine carboxypeptidase-like gene OsBISCP1 is involved in regulation of defense responses against biotic and abiotic oxidative stress. *Gene* 420: 57-65
- Liu JP, Magalhaes JV, Shaff J, Kochian LV** (2009) Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT (aluminium-activated malate transporter) families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *Plant Journal* 57: 389-399
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods* 25: 402-408
- Loake GJ, Faktor O, Lamb CJ, Dixon RA** (1991) Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 : 9230–9234

- Lu Y, Foo Y, Wong H** (1999) Sagecoumarin, a novel caffeic acid trimer from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 52: 1149-1152
- Lu YP, Li ZS, Rea PA** (1997) AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 8243-8248
- Lunkenbein S, Bellido M, Aharoni A, Salentijn EMJ, Kaldenhoff R, Coiner HA, Munoz-Blanco J, Schwab W** (2006) Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose: cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant Physiology* 140: 1047–1058.
- Luo H, Song F, Goodman RM, Zheng Z** (2005) Up-regulation of OsBIHD1, a rice gene encoding BELL homeo-domain transcriptional factor, in disease resistance responses. *Plant Biology* 7: 459-468
- Luo J, Butelli E, Hill L, Parr A, Niggeweg R, Bailey P, Weisshaar B, Martin C** (2008) AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol. *Plant Journal* 56: 316-326
- Luo J, Nishiyama Y, Fuell C, Taguchi G, Elliott K, Hill L, Tanaka Y, Kitayama M, Yamazaki M, Bailey P, Parr A, Michael AJ, Saito K, Martin C** (2007) Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 50: 678-695
- Luo L, Van Der Voet E, Huppes G, Udo De Haes HA** (2009) Allocation issues in LCA methodology : A case study of corn stover-based fuel ethanol. *International Journal of Life Cycle Assessment* 14 :529–539.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C** (2005) Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p 4-5.
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T** (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7:255–269.
- Maeshima M** (2000) Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochimica Et Biophysica Acta- Biomembranes* 1465: 37-51
- Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana UGP, Alves VMC, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Pineros MA, Shaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV** (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics* 39: 1156-1161
- Mané C** (2007). Phénomènes oxydants et composés phénoliques dans les vins blancs de Champagne : développements méthodologiques pour l'analyse des polymères, Formation Doctorale Sciences des Aliments, Montpellier Supagro pp 279.
- Mané C, Sommerer N, Yalcin T, Cheynier V, Cole RB, Fulcrand H** (2007) Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF MS analysis of protein-tannin complexes. *Analytical Chemistry* 79: 2239- 2248.

- Mané C, Souquet JM, Olle D, Verries C, Veran F, Mazerolles G, Cheynier V, Fulcrand H** (2007) Optimization of Simultaneous Flavanol, Phenolic Acid, and Anthocyanin Extraction from Grapes Using an Experimental Design: Application to the Characterization of Champagne Grape Varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 7224-7233
- Manetas Y** (2006) Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? *Flora* 201: 163-177
- Marinova K, Kleinschmidt K, Weissenbock G, Klein M** (2007) Flavonoid biosynthesis in barley primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport. *Plant Physiology* 144: 432-444
- Marinova K, Pourcel L, Weder B, Schwarz M, Barron D, Routaboul JM, Debeaujon I, Klein M** (2007) The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H<sup>+</sup>- antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell* 19: 2023-2038
- Markham KR, Gould KS, Winefield CS, Mitchella KA, Bloora SJ, Boasec MR** (2000) Anthocyanic vacuolar inclusions- their nature and significance in flower coloration. *Phytochemistry* 55: 327-336
- Marles MAS, Ray H, Gruber MY** (2003) New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* 64: 367-383
- Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V** (1995) A Glutathione-S-Transferase Involved in Vacuolar Transfer Encoded by the Maize Gene Bronze-2. *Nature* 375: 397-400
- Marshall RD** (1972) Glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 41: 673-702
- Marshall RD** (1974) The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. *Biochemical Society Symposia* 40: 17-26
- Marsischky G, LaBaer J** (2004) Many paths to many clones: A comparative look at high-throughput cloning methods. *Genome Research* 14: 2020-2028
- Martin G, Woszczyk W, Corey J, Quesnel R** (1999) Controlling phantom image focus in a multichannel reproduction system. In 107<sup>th</sup> Convention of the Audio Engineering Society, preprint no. 4996, volume 4996, New York, USA. Audio Engineering Society.
- Martinez-Ruiz A, Martinez del Pozo A, Lacadena J, Mancheno JM, Onaderra M, Lopez-Otin C, Gavilanes JG** (1998) Secretion of recombinant pro- and mature fungal  $\alpha$ -sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys- Arg motif is required for maturation. *Protein Expression and Purification* 12: 315-322.
- Martinoia E, Klein M, Gessler M, Sánchez-Fernández R, Rea PA** (2001) Vacuolar transport of secondary metabolites and xenobiotics. In: Robinson D, Rogers J (eds) *Vacuolar Compartments*, CRC Series. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, pp. 221-253
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE** (2007) Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* 58: 83-102
- Matern U, Reichenbach C, Heller W** (1986) Efficient uptake of flavonoids into parsley (*Petroselinum hortense*) vacuoles requires acylated glycosides. *Planta* 167: 183-189

- Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, Liu XL, Connors K, Matheis N, Schuster DK, Menasco DJ, Wagoner W, Lightner J, Wagner DR** (2003) Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 15: 1689-1703
- Mattivi F, Guzzon R, Vrhovsek U, Stefanini M, Velasco R** (2006) Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7692-7702
- Matus JT, Aquea F, Arce-Johnson P** (2008) Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. *BMC Plant Biology* 8: 83
- Matus JT, Loyola R, Vega A, Pena-Neira A, Bordeu E, Arce-Johnson P, Alcalde JA** (2009) Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *Journal of Experimental Botany* 60(3): 853-867
- Matus JT, Poupin MJ, Canon P, Bordeu E, Alcalde JA, Arce-Johnson P** (2010) Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology* 72: 607–620.
- McAbee JM, Hill TA, Skinner DJ, Izhaki A, Hauser BA, Meister RJ, Venugopala Reddy G, Meyerowitz EM, Bowman JL, Gasser CS** (2006) ABERRANT TESTA SHAPE encodes a KANADI family member, linking polarity determination to separation and growth of *Arabidopsis* ovule integuments. *Plant Journal* 46:522–531
- McIntosh CA and Mansell RL** (1990) Biosynthesis of naringin in *Citrus paradisi*: UDP-glucosyltransferase activity in grapefruit seedlings. *Phytochemistry* 29: 1533- 1538.
- Meißner D, Albert A, Böttcher C, Strack D, Milkowski C** (2008) The role of UDP-glucose: hydroxycinnamate glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism and the response to UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 228: 663-674.
- Mellway RD, Tran LT, Prouse MB, Campbell MM, Constabel CP** (2009) The wound-, pathogen-, and ultraviolet B-responsive MYB134 gene encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates proanthocyanidin synthesis in poplar. *Plant Physiology* 150: 924–941
- Mendez M, Jones DG, Manetas Y** (1999) Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *New Phytologist* 144: 275-282
- Menting JGT, Scopes RK, Stevenson TW** (1994) Characterization of Flavonoid 3',5'- Hydroxylase in Microsomal Membrane-Fraction of *Petunia-Hybrida* Flowers. *Plant Physiology* 106: 633-642
- Meyer K, Van Dyk DE, Vitanen PV** (2003) UDP glucosyltransferases. Patent WO 03/066836 A2.
- Milkowski C, and Strack D** (2004). Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry*. 66: 517–524.
- Milkowski C, Baumert A, Schmidt D, Nehlin L, Strack D** (2004) Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant Journal* 38: 80-92

- Milkowski C, Baumert A, Strack D** (2000a) Identification of four *Arabidopsis* genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferase. *FEBS Letters* 486: 183–184
- Milkowski C, Baumert A, Strack D** (2000b) Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose: sinapate glucosyltransferase. *Planta* 211: 883–886
- Mock HP, Vogt T, Strack D** (1992) Sinapoylglucose: malate sinapoyltransferase activity in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa*. *Z Naturforsch Teil* 47:680-682
- Mock JF and Strack D** (1993) Energetics of the uridine 5'-diphosphoglucose hydroxycinnamic acid acyl-glucosyltransferase reaction. *Phytochemistry* 32: 575–579.
- Mol J, Grotewold E, Koes R** (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3: 212-217
- Molendijk AJ, Ruperti B, Palme K** (2004) Small GTPases in vesicle trafficking. *Plant Biology* 7: 694-700.
- Mollicone R, Gibaud A, Francois A, Ratcliffe M, Oriol R** (1990) Acceptor specificity and tissue distribution of three human  $\alpha$ -3-fucosyltransferases. *European Journal of Biochemistry* 191: 169-176.
- Monagas M, Bartolome B, Gomez-Cordoves C** (2005) Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 85–118.
- Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Laureano O, Silva JMR** (2003). Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 6475-6481.
- Mori K, Sugaya S, Gemma H** (2005) Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 105: 319-330.
- Morita M, Shitan N, Sawada K, Van Montagu MCE, Inze D, Rischer H, Goossens A, Oksman-Caldentey KM, Moriyama Y, Yazaki K** (2009) Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 2447-2452
- Morita Y, Kataoka A, Shiota S, Mizushima T, Tsuchiya T** (2000) NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na<sup>+</sup>-driven multidrug efflux pump. *Journal of Bacteriology* 182: 6694- 6697
- Moriyama Y, Hiasa M, Matsumoto T, Omote H** (2008) Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)- type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica* 38: 1107-1118
- Moustafa E, Wong E** (1967) Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry* 6: 625–632
- Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V** (2000) AN9, a petunia glutathione S- transférase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology* 123: 1561-1570

- Mueller LA, Walbot V** (2001) Models for vacuolar sequestration of anthocyanins. Regulation of Phytochemicals by Molecular Techniques 35: 297-312
- Mugford ST, Qi X, Bakht S, Hill L, Wegel E, Hughes RK, Papadopoulou K, Melton R, Philo M, Sainsbury F, Lomonosoff GP, Roy AD, Goss RJM, Osbourn A** (2009) A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. Plant Cell 21: 2473-2484
- Munro S, Pelham HR** (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell 48: 899-907.
- Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, Ishizuka A, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T** (2009), Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*, Planta 230 : 17–527.
- Nagashima S, Tomo S, Orihara Y, Yoshikawa T** (2004) Cloning and characterization of glucosyltransferase cDNA from Eucalyptus perriniana cultured cells. Plant Biotechnology 21: 343–348.
- Nakanishi T, Inoue H, Kitamura M** (2003) Cloning and expression of the superoxide dismutase gene from the obligate anaerobic bacterium *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F). Journal of Biochemistry 133: 387-93.
- Negrel, J and Martin C** (1984). The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry 23: 2797-2801.
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L** (2000) The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques. Plant Cell 12: 1863-1878
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Stewart AJ, Jenkins GI, Caboche M, Lepiniec L** (2002) The TRANSPARENT TESTA16 locus encodes the *Arabidopsis* BSISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. Plant Cell 14: 2463-2479.
- Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L** (2001) The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3- MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. Plant Cell 13: 2099-2114
- Nielsen TL, Holmberg S, Petersen JGL** (1990) Regulated Overproduction and Secretion of Yeast Carboxypeptidase Y, Applied Microbiology and Biotechnology 33:307-312.
- Niemetz R and Gross GG** (2001) Gallotannin biosynthesis:  $\beta$ -glucogallin: hexagalloyl 3-O-galloyltransferase from *Rhus typhina* leaves. Phytochemistry 58: 657–661.
- Niggeweg R, Michael A, Martin C** (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. Nature Biotechnology 22: 746-754.
- Noda N, Higaki T, Sano T, Kazuma K, Sasaki T, Hasezawa S, Suzuki M** (2007) The subcellular localization and substrate specificity of 1-O- acylglucose dependent anthocyanin acyltransferase from blue petal of butterfly pea (*Clitoria ternatea*). Plant and Cell Physiology 48

- Noda N, Kazuma K, Sasaki T, Tsugawa H, Suzuki M** (2006) Molecular cloning of 1-O-acetylglucose dependent anthocyanin aromatic acyltransferase in ternatin biosynthesis of butterfly pea (*Clitoria ternatea*). *Plant Cell Physiol.* 47 :109
- Noguchi A, Horikawa M, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M, Iuchi-Okada A, Ishiguro M, Kiso Y, Nakayama T, Ono E** (2009) Local differentiation of sugar donor specificity of flavonoid glycosyltransferase in Lamiales. *Plant Cell* 21: 1556–1572
- Nunan KJ, Davies C, Robinson SP, Fincher GB** (2001) Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* 214: 257-264.
- Oba K, Conn EE, Canut H, Boudet AM** (1981) Subcellular Localization of 2-( $\beta$ -D-Glucosyloxy)-Cinnamic Acids and the Related  $\beta$ -glucosidase in Leaves of *Melilotus alba* cultivar. *Plant Physiol* 68, 1359-1363. *Plant Physiology* 1 *Plant Molecular Biology* 68: 1359-1363
- Offen W, Martinez-Fleites C, Yang M, Lim EK, Davis BG, Tarling CA** (2006) Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 25:1396-1405.
- Ojeda H, Deloire A, Carbonneau A** (2001) Influence of water deficits on grapeberry growth. *Vitis* 40 3: 141-145.
- Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y** (2006) The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends in Pharmacological Sciences* 27: 587-593
- Ong BY and Nagel CW** (1978) High-pressure liquid chromatographic analysis of hydroxycinnamic acid tartaric acid esters and their glucose esters in *V. vinifera*. *Journal of Chromatography* 157: 345-355.
- Ono E, Ruike M, Iwashita T, Nomoto K, Fukui Y** (2010) Copigmentation and flavonoid glycosyltransferases in blue *Veronica persica* flowers. *Phytochemistry* 71: 726–735.
- Ormrod DP, Landry LG, Conklin PL** (1995) Short-term UV-B radiation and ozone exposure effects on aromatic secondary metabolite accumulation and shoot growth of flavonoid-deficient *Arabidopsis* mutants. *Plant physiology* 93:602-610.
- Osbourn** (2010) Gene clusters for secondary metabolic pathways: an emerging theme in plant biology. *Plant physiol* 154: 531-535.
- Osbourn AE** (2003) Molecules of interest : Saponins in cereals. *Phytochemistry* 62 : 1–4.
- Osmani SA, Bak S, Imberty A, Olsen CE, Møller BL** (2008) Catalytic key amino acids and UDP-sugar donor specificity of a plant glucuronosyltransferase, UGT94B1: molecular modeling substantiated by site-specific mutagenesis and biochemical analyses. *Plant Physiology* 148:1295-1308
- Pak JE, Arnoux P, Zhou S, Sivarajah P, Satkunarajah M, Xing X, Rini JM** (2006) X-ray crystal structure of leukocyte type core 2  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. Evidence for a convergence of metal ion-independent glycosyltransferase mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 281: 26693-701.

- Pang Y, Peel GJ, Wright E, Wang ZY, Dixon RA** (2007) Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 145: 201–215
- Pang Y, Wenger JP, Saathoff K, Peel GJ, Wen J** (2009) A WD40 repeat protein from *Medicago truncatula* is necessary for tissue-specific anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis, but not for trichome development. *Plant Physiology* 151: 1117-1129.
- Pang YZ, Peel GJ, Sharma SB, Tang YH, Dixon RA** (2008) A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14210-14215
- Paquette S, Moller BL, Bak S** (2003) On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* 62: 399–413.
- Parham RA and Kaustinen HM** (1977) On the site of tannin synthesis in plant cells. *Bot. Gazz.* 138: 465-467
- Parry AD and Edwards R** (1994) Characterization of O-glucosyl-transferases with activities toward phenolic substrates in alfalfa. *Phytochemistry* 37: 655–661
- Pascal C, Poncet-Legrand C, Cabane B, Vernhet A** (2008) Aggregation of a proline-rich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins: Effect of protein glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6724-6732.
- Passamonti S, Cocolo A, Braidot E, Petrusa E, Peresson C, Medic N, Macri F, Vianello A** (2005) Characterization of electrogenic bromosulphophthalein transport in carnation petal microsomes and its inhibition by antibodies against bilitranslocase. *FEBS Journal* 272: 3282-3296.
- Passamonti S, Macri F, Vianello A** (2008) Evidence for a putative flavonoid translocator similar to mammalian bilitranslocase in grape berries (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Planta* 228: 203-213
- Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F** (2002) The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296: 631-636
- Peel GJ, Pang YZ, Modolo LV, Dixon RA** (2009) The LAP1 MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago*. *Plant Journal* 59: 136-149
- Peer WA, Murphy AS** (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Science* 12: 556–563
- Peyron S, Chaurand M, Rouau X, Abecassis J** (2002) Relationship between branmechanical properties and milling behaviour of durum wheat(*Triticum durum* Desf.). Influence of tissue thickness and cell wall structure. *Journal of Cereal Science* 36: 377-386
- Pfeiffer J, Kuhnel C, Brandt J, Duy D, Punyasiri PAN, Forkmann G, Fischer TC** (2006) Biosynthesis of catechins by leucoanthocyanidin 4-reductases (LAR) and anthocyanidin reductases (ANR) in leaves of grape (*Vitis vinifera*), apple (*Malus x domestica*) and other crops. *Plant Physiol Biochem* 44(5–6):323–334
- Pflugmacher S, Sandermann H** (1998) Taxonomic distribution of plant glycosyltransferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 49:507–11

- Pirie A, Mullins MG** (1976) Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate and abscisic acid. *Plant Physiology* 58: 468-472.
- Porter LJ, Hritsch LN, Chan BG** (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25:223-230.
- Pourcel L, Routaboul J-M, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I** (2005) TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *The Plant Cell* 17: 2966-2980.
- Poutska F, Irani NG, Feller A, Lu Y, Pourcel L, Frame K, Grotewold E** (2007) A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein sorting route in Arabidopsis and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant Physiology* 145: 1323-1335.
- Pradhan MK, Nayak L, Joshi PN, Mohapatra PK, Patro L, Biswal B, Biswal UC** (2008) Developmental phase-dependent photosynthetic responses to ultraviolet-B radiation: damage, defence, and adaptation of primary leaves of wheat seedlings. *Photosynthetica* 46: 370-377
- Price SF, Breen PJ, Valladao M, Watson BT** (1995) Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot-Noir Grapes and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 187-194
- Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M** (1994) Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds. *Phytochemistry* 36: 781-784
- Quiel JA and Bender J** (2003). Glucose conjugation of anthranilate by the Arabidopsis UGT74F2 glucosyltransferase is required for tryptophan mutant blue fluorescence. *Journal of biological Chemistry* 278: 6275-6281.
- Ramsay NA, Glover BJ** (2005) MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends of Plant Science* 10:63-70
- Rataboul P, Alibert G, Boller T, Boudet AM** (1985) Intracellular transport and vacuolar accumulation of o-coumaric acid glucoside in *Melilotus alba* mesophyll cell protoplasts. *Biochimica and Biophysica Acta* 816: 25-36
- Rausher MD** (2006). The evolution of flavonoids and their genes. pp. 175-212 in E. Grotewold, ed. *The science of flavonoids*. Springer, NY. 2008. Evolutionary transitions in flower color. *Journal of Plant Science* 169:721
- Rausher MD** (2008) Evolutionary transitions in floral color. *International Journal of Plant Science* 169: 7-21.
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST** (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 14: 6-27
- Reinders A, Sivitz AB, Starker CG, Gantt JS, Ward JM** (2008) Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* 68: 289-299
- Remy-Tanneau S, Le Guerneve C, Meudec E, Cheynier V** (2003) Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3592-2597.

- Reynier A** (2007) Manuel de viticulture. 10e edition. Editions TEC&DOC, Lavoisier. 532p
- Ribéreau- Gayon P** (1964) Les Composes Phenoliques du Raisin et du Vin, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris
- Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdiou D** (2006) Handbook of enology, Volume 2. The chemistry of wine. Stabilization and treatments. Edition Wiley. 441p
- Ribéreau-Gayon P, Stonestreet E** (1965) Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. Bulletins de la Société de Chimie 9 : 2649-2652.
- Ricardo da Silva JM, Cheynier V, Souquet JM, Moutounet M, Cabanis JC, Bourzeix M** (1991b) Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. Journal of Science Food and Agriculture 57: 111-125.
- Ricardo da Silva JM, Darmon N, Fernandez Y, Mitjavila S** (1991c) Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. Journal of Agriculture and Food Chemistry 39: 1549-1552.
- Ricardo da Silva JM, Rigaud J, Cheynier V, Cheminat A, Moutounet M** (1991d) Procyanidin dimers and trimers from grape seeds Phytochemistry 4: 1259-1264.
- Ricardo da Silva, JM, Bourzeix M, Cheynier V, Moutounet M** (1991a) Procyanidin composition of Chardonnay, Mauzac and Grenache blanc grapes. Vitis 30: 245-252.
- Richman A, Swanson A, Humphrey T, Chapman R, McGarvey BD, Pocs R, Brandle J** (2005) Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. Plant Journal 41:56–67
- Ristic R and Hand PG** (2005) Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. Australian Journal of Grape and Wine Research 11: 43-58
- Roberts CJ, Nothwehr SF, Stevens TH** (1992) Membrane protein sorting in the yeast secretory pathway: evidence that the vacuole may be the default compartment. The Journal of Cell Biology. 119(1): 69–83.
- Roby G, Habertson JF, Adams DA, Matthews MA** (2004) Berry size and wine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. Australian Journal of Grape and Wine Research 10 : 100-107.
- Roggero J, Larice J, Rocheville-Divorne C, Archier P, Cohen S** (1988) Composition anthocyanique des cépages: essai de classification par analyse en composantes principales et analyse factorielle discriminante. Cahiers scientifiques RFOE n°112: 277-284
- Romeyer FM, Macheix J, Sapis J** (1986) Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. Phytochemistry, 25: 219-21.
- Romeyer FM, Macheix JJ, Goiffon JJ, Reminac CC, Sapis JC** (1983) The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. Journal of Agriculture and Food Chemistry 31: 346-349.

- Ross J, Li Y, Lim EK, Bowles DJ** (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biology* 2: 3004.1–3004.6
- Rozen S, Skaletsky H** (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365-386
- Russell DW, Conn EE** (1967) The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 122: 256 – 258
- Sagasser M, Lu GH, Hahlbrock K, Weisshaar B** (2002) *A. thaliana* TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Genes & Development* 16: 138-149
- Saint Pierre B, De Luca V** (2000) Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHF superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In: Romeo JT, Ibrahim R, Varin L, De Luca V (eds) Evolution of metabolic pathways. *Recent Advances in Phytochemistry* 34: 285–315
- Salagoity-Auguste MH, Bertrand A** (1984) Wine phenolics: analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography. *Journal of Science Food and Agriculture* 35:1241-1247
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Molecular cloning
- Sanchez-Fernández R, Davies TGE, Coleman JOD, Rea PA** (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily: A complete inventory. *Journal of Biology Chemistry* 276: 30231–30244.
- Sandermann H** (1992) Plant-Metabolism of Xenobiotics - the Green Liver Concept. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 204: 62
- Sarni-Manchado P and Cheynier V** (2002) Study of noncovalent complexation between catechin derivatives and peptide by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). *Journal of Mass Spectrometry* 37(6), 609-616.
- Sarni-Manchado P, Cheynier V and Moutounet M** (1999) Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 42-47.
- Saslowsky D, Winkel-Shirley B** (2001) Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 27: 37-48
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Katoh T, Asamizu E, Tabata S** (2000) Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3. I. Sequence features of the regions of 4,504,864 bp covered by sixty P1 and TAC clones. *DNA Research* 7: 131–135
- Saucier C** (1997) Les tanins du vins : étude de leur stabilité colloïdale. Thèse de doctorat. Bordeaux: Université Bordeaux II.
- Saucier C, Bourgeois G, Vitry C, Roux D, Glories Y** (1997) Characterization of (+)-Catechin-Acetaldehyde polymers: a model for colloidal state of Wine polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(4): 1045-1049.

- Saucier C, Little D, Glories Y** (1997) First evidence of acetaldehyde- flavanol condensation products in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 48(3): 370- 373.
- Schijlen EGW, de Vos CHR, van Tunen AJ, Bovy AG** (2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65: 2631-2648
- Schlosser J, Olsson N, Weis M, Reid K, Peng F, Lund S, Bowen P** (2008) Cellular expansion and gene expression in the developing grape (*Vitis vinifera* L.). *Protoplasma* 232: 255-265
- Schmidt A, Scheel D, Strack D** (1998) Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* 205: 51–55
- Schulte A, Lorenzen I, Bottcher M, Plieth C** (2006) A novel fluorescent pH probe for expression in plants. *Plant Methods* 2: 1–13
- Schwinn K, Venail J, Shang YJ, Mackay S, Alm V, Butelli E, Oyama R, Bailey P, Davies K, Martin C** (2006) A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell* 18: 831-851
- Sefton MA, Francis IL, Williams PJ** (1994) Free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Food Science* 59 : 142–147
- Sharp PM, Li WH** (1987) The codon Adaptation Index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research* 15: 1281–1295
- Shih CH, Chu H, Tang LK, Sakamoto W, Maekawa M, Chu IK, Wang M, Lo C** (2008) Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. *Planta*. 228(6):1043-54
- Shirley AM and Chapple C** (2003). Biochemical characterisation of sinapoyl:choline sinapoyltransferase, a serine carboxypeptidase-like protein that functions as an acyltransferase in plant secondary metabolism. *Journal of Biology Chemistry* 278: 19870–19877
- Shirley AM, McMichael CM, Chapple C** (2001) The *sng2* mutant of *Arabidopsis* is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase. *Plant Journal* 28: 83-94
- Shirley BA, Stanssens P, Hahn U, Pace CN** (1992) Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochemistry* 31:725–731.
- Shirley BW, Kubasek WL, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel FM, Goodman HM** (1995) Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant Journal* 8: 659-671
- Shoji T, Inai K, Yazaki Y, Sato Y, Takase H, Shitan N, Yazaki K, Goto Y, Toyooka K, Matsuoka K, Hashimoto T** (2009) Multidrug and Toxic Compound Extrusion-Type Transporters Implicated in Vacuolar Sequestration of Nicotine in Tobacco Roots. *Plant Physiology* 149: 708-718
- Simon C, Barathieu K, Laguerre M, Schmitter JM, Fouquet E, Pianet I, Dufourc EJ** (2003) Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochemistry*, 42: 10385-10395.

- Singleton V L, Draper D** (1964) The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 15: 34-40.
- Singleton VL** (1972) Common plant phenols other than anthocyanins, contribute to coloration and discoloration. *The Chemistry of Plant Pigments* 43: 191
- Singleton VL** (1992) Tannins and the qualities of wines. In *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*. R.W. Hemingway (Ed). 859-880.
- Singleton VL and Esau P** (1969) Phenolic substances in grapes and wine and their significance. *Advances in Food research*
- Singleton VL, Timberlake CF, Lea AGH** (1978) The phenolic cinnamates of grapes and wine, *Journal of Sciences and Food Agriculture*. 29: 403-410.
- Singleton VL, Zaya J, Trousdale EK** (1986) Caftaric and coumaric acids in fruits of vitis. *Phytochemistry* 25 : 2127 -2133
- Singleton VL**. 1972. Common plant phenols other than anthocyanins, contribute to coloration and discoloration. In: Crichester CO ed. *The Chemistry of Plant Pigments*, Academic Press, New York, 43-191.
- Smith GJ, Markham KR** (1998) Tautomerism of flavonol glucosides - relevance to plant UV protection and flower colour. *Journal of Photochemistry and Photobiology A - Chemistry* 118: 99-105
- Souquet JM, Cheynier V, Brossaud F, Moutounet M** (1996) Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *phytochemistry* 43: 509-512.
- Souquet JM, Cheynier V, Moutounet M** (2000) The proanthocyanidines du raisin. *Bulletin de L'OIV* 835-836
- Souquet JM, Veran F, Mané C, Cheynier V** (2006) Optimization of extraction conditions on phenolic yields from the different parts of grape clusters: quantitative distribution of their proanthocyanidins. In F Daayf, A El Hadrami, L Adam, GM Ballance, eds, XXIII International Conference on Polyphenols, Winnipeg, Manitoba, Canada. Groupe Polyphénols, Bordeaux, France, 245-246.
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C** (1994) Cloning and Molecular Analysis of Structural Genes Involved in Flavonoid and Stilbene Biosynthesis in Grape (*Vitis-Vinifera* L). *Plant Molecular Biology* 24: 743-755
- Spayd SE, Tarara JM, Mee DL, Ferguson JC** (2002) Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American journal of Enology and viticulture* 53: 171-182.
- Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K** (2003) Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Product Reports* 20: 288-303
- Sriubolmas N, Panbangred W, Sriurairatana S, Meevootisom V.** (1997) Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 47:373-8.

- Stafford HA** (1974) Possible multienzyme complexes regulating the formation of C6-C3 phenolic compounds and lignins in higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 8: 53-79
- Stafford HA, Lester HH** (1982) Enzymic and Non-Enzymic Reduction of (+)-Dihydroquercetin to Its 3,4-Diol. *Plant Physiology* 70: 695-698
- Steffens JC** (2000) Acyltransferases in protease's clothing. *Plant Cell* 12:1253 -1255
- Stehle F, Brandt W, Milkowski C, Strack D** (2006). Structure determinants and substrate recognition of serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plant secondary metabolism. *FEBS Letters* 580: 6366–6374.
- Stehle F, Stubbs M, Strack D, Milkowski C** (2008). Heterologous expression of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase and characterisation of the kinetic mechanism. *FEBS Journal* 275: 775–787.
- Stone BC** (1979) Protective Coloration of Young Leaves in Certain Malaysian Palms. *Biotropica* 11: 126-126
- St-Pierre B, De Luca V** (2000) Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Evolution of Metabolic Pathways* 34: 285-315
- St-Pierre B, Laflamme P, Alarco AM, De Luca V** (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant Journal* 14:703-713
- Strack D** (1982) Development of 1-O-sinapoyl-  $\beta$ -D-glucose: L-malate sinapoyltransferase activity in cotyledons of red radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Planta* 155: 31-36
- Strack D, Ellis BE, Grawe W, Heilemann J** (1990) Sinapoylglucose: malate sinapoyltransferase activity in seeds and seedlings of rape. *Planta* 180:217–219
- Strack D, Keller H, Weissenbock G** (1987b) Enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acids esters of sugar acids and hydroaromatic acids by protein preparation from rye (*Secale cereale*) primary leaves. *Journal of Plant Physiology* 131:61–73
- Strack D, Mock, HP** (1993) Hydroxycinnamic acids and lignins. *Plant Biochemistry* 9: 45-97
- Strack D, Reinicke J, Takeuchi S** (1986) Evidence of a relationship between malate metabolism and activity of 1-sinapoylglucose: L-malate sinapoyltransferase in radish (*Raphanus sativus* L.) cotyledons. *Planta* 167 212-217
- Strack D, Sharma V, Felle H** (1987a) Vacuolar pH in radish cotyledonal mesophyll cells. *Planta* 172:563-565
- Strack D.** 1982. Development of 1-O-sinapoyl-  $\beta$ -D-glucose: L-malate sinapoyltransferase activity in cotyledons of red radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Planta* **155**, 31-36.
- Sullivan ML** (2009) A novel red clover hydroxycinnamoyl transferase has enzymatic activities consistent with a role in phaselic acid biosynthesis . *Plant Physiol* 150 : 1866 – 1879

- Suzuki H, Sawada S, Watanabe K, Nagae S, Yamaguchi M, Nakayama T, Nishino T** (2004) Identification and characterization of a novel anthocyanin monoglucosyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers: an enzyme that is phylogenetically separated from other anthocyanin acyltransferases. *Plant Journal* 38: 994-1003
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y** (2003) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *Journal of Biology Chemistry* 278: 22644-22649
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR** (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol* 140: 150-158
- Sze H, Li XH, Palmgren MG** (1999) Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677-689
- Tacke E, Korfhage C, Michel D, Maddaloni M, Motto M, Lanzini S, Salamini F, Döring HP** (1995) Transposon tagging of the maize Glossy2 locus with the transposable element En/Spm. *Plant Journal* 8: 907-917.
- Taguchi G, Fujikawa S, Yazawa T, Kodaira R, Hayashida N, Shimosaka M, Okazaki M** (2000) Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science* 151: 153-161
- Talcott ST and Lee JH** (2002) Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50 (11) :3186-3192
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A** (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* 54: 733-749
- Tanner GJ, Francki KT, Abrahams S, Watson JM, Larkin PJ, Ashton AR** (2003) Proanthocyanidin biosynthesis in plants - Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *Journal of Biological Chemistry* 278: 31647-31656
- Taylor LP** (1995) Flavonols - Effects on Fertility and Fecundity. *Crop Science* 35: 1521-1526
- Terrier N, Deguilloux C, Sauvage FX, Martinoia E, Romieu C** (1998) Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 367-377
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barrieu F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Leon C, Renaudin JP, Dedaldechamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S** (2005) Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* 222: 832-847
- Terrier N, Sauvage FX, Ageorges A, Romieu C** (2001) Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta* 213: 20-28
- Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, Vialet S, Verries C, Cheynier V, Romieu C** (2009) Ectopic Expression of VvMybPA2 Promotes Proanthocyanidin Biosynthesis in Grapevine and Suggests Additional Targets in the Pathway. *Plant Physiology* 149: 1028-1041

- Tesniere C, Torregrosa L, Pradal M, Souquet JM, Gilles C, Dos Santos K, Chatelet P, Gunata Z** (2006) Effects of genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels on the response to stress and the synthesis of secondary metabolites in grapevine leaves. *Journal of Experimental Botany* 57: 91-9.
- Teusch M, Forkmann G, Seyffert W** (1986) Genetic control of UDPglucose: anthocyanin 5-O-glucosyltransferase from flowers of *Matthiola incana*. *Planta* 168: 586–591.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4380
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima J, Awazuhara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama M, Noji M, Yamazaki M, Saito K** (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant Journal* 42: 218-235
- Torregrosa L, Bouquet A** (1997) *Agrobacterium rhizogenes* and *A-tumefaciens* cotransformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49: 53-62
- Torregrosa L, Verrie's C, Tesniere C** (2002) Grapevine (*Vitis vinifera* L.) promoter analysis by biolistic mediated transient transformation of cell suspensions. *Vitis* 41: 27–32
- Touriol C, Bornes S, Bonnal S, Audigier S, Prats H, Prats AC, Vagner S** (2003) Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biology of the Cell* 95:169–178
- Tuominen LK, Johnson VE, Tsai CJ** (2011) Differential Phylogenetic Expansions in BAHD Acyltransferases Across Five Angiosperm Taxa and Evidence of Divergent Expression Among *Populus* Paralogues. *BMC Genomics*.12: 236.
- Unno H, Ichimaida F, Suzuki H, Takahashi S, Tanaka Y, Saito A, Nishino T, Kusunoki M, Nakayama T**(2007) Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis. *Journal of Biology Chemistry* 282: 15812–15822
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD** (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 46: 4113–4117.
- Verries C, Guiraud JL, Souquet JM, Vialet S, Terrier N, Olle D** (2008) Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5896-5904
- Versari A, Parpinello GP, Tornielli GB, Ferrarini R, Giulive C** (2001) Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, UV treatment in grape cv. Corina. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 5531–5536
- Verweij W, Spelt C, Di Sansebastiano G-P, Vermeer J, Reale L, Ferranti F, Koes R, Quattrocchio F** (2008) An H<sup>+</sup> P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour. *Nature Cell Biology* 10: 1456-1462

- Villegas RJA, Kojima M** (1986) Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose. *Journal of Biological Chemistry* 261: 8729-8733
- Vogelstein B, Gillespie D** (1979) Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 615-619
- Vogt T, Jones P** (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Science* 5: 380–386
- Vom Endt D, Kijne JW, Memelink J** (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: What regulates the regulators? *Phytochemistry (Oxford)* 61: 107-114
- Waldron KW, Smith AC, Parr AJ, Ng A, Parker ML** (1997) New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science and Technology* 8: 213-221
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC** (1999) The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11: 1337-1350
- Walker AR, Lee E, Bogs J, McDavid DAJ, Thomas MR, Robinson SP** (2007) White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant Journal* 49:772-785.
- Wang J, De Luca V** (2005) The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including ‘foxy’ methylanthranilate. *Plant J* 44: 606–619
- Waterhouse AL** (2002) Determination of total phenolics. In: Wrolstad, E.R.E., Editor, 2002. *Current protocols in food analytical chemistry*, Wiley, New York, pp. II.1.1–II.1.8.
- Waterhouse AL, Lamuelaraventos RM** (1994) The Occurrence of Piceid, a Stilbene Glucoside, in Grape Berries. *Phytochemistry* 37: 571-573
- Wei YL, Li JN, Lu J, Tang ZL, Pu DC, Chai YR** (2007) Molecular cloning of Brassica napus TRANSPARENT TESTA 2 gene family encoding potential MYB regulatory proteins of proanthocyanidin biosynthesis. *Molecular Biology Reports* 34: 105-20
- Weidner S, Paprocka J** (1996) Phenolic acids and dormancy in oat (*Avena sativa* L.) and rye (*Secale cereale* L.) caryopses. *Acta Physiologiae Plantarum* 18 : 277-286.
- Weier D, Mittasch J, Strack D, Milkowski C** (2008) The genes BnSCT1 and BnSCT2 from Brassica napus encoding the final enzyme of sinapine biosynthesis: Molecular characterization and suppression. *Planta* 227: 375–385.
- Weinges K and Piretti MV** (1971) Isolierung des C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>-procyanidins B1 aus Wientrauben. *Liebig's Annalen Chemistry* 748:218–220
- Weinges K, Ebert W, Huthwelker D, Mattauch H, Perner J** (1969) Oxidative Kupplung von Phenolen II. Konstitution und Bildungsmechanismus des Dehydro-dicatchins A. *Liebig's Annalen* 726 : 114–124.
- Werner C, Matile P** (1985) Accumulation of coumarylglucosides in vacuoles of barley mesophyll protoplasts. *Journal of Plant Physiology* 118: 237-249

- Winkel-Shirley B** (1999) Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* 107: 142-149
- Winkel-Shirley B** (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126: 485-493
- Winkel-Shirley B** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Plant Biology* 5: 218-223
- Winkler AJ, Cook JA, Kliever WM, Lider LA** (1974) *General Viticulture*. University of California Press, Berkeley.
- Wulf LW, Nagel CW** (1976) High pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture* 29: 42-49.
- Xie D, Jackson LA, Cooper JD, Ferreira D, Paiva NL** (2004a) Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 134: 979-994
- Xie D, Sharma SB, Dixon RA** (2004b) Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 422: 91-102
- Xie DY and Dixon RA** (2005) Proanthocyanidin biosynthesis still more questions than answers? *Phytochemistry* 66: 2126–2143.
- Xie DY, Sharma SB, Paiva NL, Ferreira D, Dixon RA** (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* 299: 396–399.
- Yalpani N, Shulaev V, Raskin I** (1993) Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology* 83: 702-708.
- Yang Q, Rheiherd K, Schlitz E, Matern U** (1997) Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA : anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Molecular Biology* 35: 777-789.
- Yazaki K, Inushima K, Kataoka M, Tabata M** (1995) Intracellular localization of UDPG: p-hydroxybenzoate glucosyltransferase and its reaction product in *Lithospermum* cell cultures *Phytochemistry* 38: 1127-1130
- Yilmaz Y and Toledo RT** (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 255–260.
- Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Fukuchi-Mizutani M, Fujiwara H, Fukui Y, Ashikari T, Murakami Y, Yamaguchi M, Kusumi T** (2000) Molecular and biochemical characterization of a novel hydroxycinnamoyl-CoA: Anthocyanin 3-O-glucoside-6"-O-acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant and Cell Physiology* 41: 495-502
- Yoshida K, Iwasaka R, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Sakuta M** (2008) Functional differentiation of *Lotus japonicus* TT2s, R2R3-MYB transcription factors comprising a multigene family. *Plant Cell Physiol* 49:157–169

- Young DA, Young E, Roux DG, Brandt EV, Ferreira D** (1987) Synthesis of condensed tannins. Part 19. Phenol oxidative coupling of (+)-catechin and (+)-mesquitol. Conformation of bis-(+)-catechins. *Journal of the Chemical Society* 1: 2345–2351.
- Yu M and Facchini PJ** (1999) Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl) transferase from opium poppy. *Planta* 209:33–44.
- Yu XH** (2009) BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: bioinformatics and gene expression. *Plant Molecular Biology* 70: 421–42.
- Yu XH, Chen MH, Liu CJ** (2008) Nucleocytoplasmic-localized acyltransferases catalyze the malonylation of 7-O-glycosidic (iso) flavones in *Medicago truncatula*. *Plant Journal* 55: 382–396.
- Yu XH, Gou JY, Liu CJ** (2009) BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: bioinformatics and gene expression. *Plant Molecular Biology* 70: 421–42.
- Zhang H, Wang L, Deroles S, Bennett R, Davies K** (2006) New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology* 6
- Zhao J and Dixon RA** (2009) MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 2323–2340.
- Zhao J and Dixon RA** (2010) The “ins” and “outs” of flavonoid transport. *Trends Plant Science* 15: 72–80.
- Zhao J, Connorton JM, Guo Y, Li X, Shigaki T, Hirschi KD and Pittman JK** (2009) Functional studies of split *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *Journal of Biological Chemistry* 284: 34075–34083.
- Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H,** (2010) Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327: 1000–1004.
- Zheng RL, Wang PF, Gao JJ, Jia ZJ, Wang WF, Yao SD, Lian ZR, Zhang JS, Lin NY** (1995) Reaction of hydroxyl radical with phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* species: a pulse radiolysis study. *Science* 25: 848.
- Zheng X, Ding Z, Xu Y, Monroig O, Morais S, Tocher DR** (2009) Physiological roles of fatty acyl desaturase and elongase in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl  $\Delta 6$  desaturase and Elovl5 elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 290: 122–131.
- Zhou A and Li J** (2005) *Arabidopsis* BRS1 is a secreted and active serine carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry* 280: 35554–35561.

## **ANNEXES**

## ANNEXE 1 : SEQUENCES PROTEIQUES

>VvgGT1

MGSESKLVHVFLVSFPGQGHVNPLRLGKRLASKGLLVTFSTPESIGKQMRKASNITDQPTPVGEGILRFEFFED  
EWDENEPKRQDLDLYLPLQLELVGKKVLPQMIKKHAEQDRPVSCLIINNPFIPWVSDVAADLGLPSAMLWVQSCACF  
STYYHYHGLVFPFSEAEPEIDVQLPCMPLLKYDEVASFLYPTTPYPFLRRAILGQYRNLDPKFCILMDTFQELE  
PEVIEYMSKICPIKPVGPLYKNPKVPNAAVRGDFMKADDCIEWLDSKRPSSIVYVSFSGSVVYLKQDQVDEIAYGL  
LNSGLQFLWVMKPPHKDAGLELLVLPEGFLEKAGDKGKVVQWSPQEQVLAHPSVACFVTHCGWNSMEALSSGMP  
VVAFPQWGDQVTDKYLVDVFKIGVRMCRGEAENKLITRDEVEKCLIEATTRPKAAELKQNAMKWKKAEEQVAE  
GGSSERNLQGFVDEVRRRSIEIIYKTKI

>VvgGT2

MGSESKLVHVFLVSFPGQGHVNPLRLGKRLASKGLLVTFSTPESIGKQMRKASNITDQPTPVGDGMIRFEFFED  
GWDENEPKRQDLDLYLPLQLELVGKKIIPMIKKNAEQDRPVSCLIINNPFIPWVSDVAADLGLPSAMLWVQSCACL  
STYYHYHGLVFPFSEAEPEIDVQLPCMPLLKYDEIASFLYPTTPYPFLRRAILGQYKNDPKFCILMDTFQELE  
PEVIEYMSKICPIKPVGPLYKNPKVPNAAVRGDFMKADDCIEWLDSKPPSSVVIISFGSVVYLKQEQVDEIAYGL  
LNSGVQFLWVMKPPHKDAGLELLVLPEGFLEKAGDKGKVVQWSPQEQVLAHPSVACFVTHCGWNSMEALSSGMP  
VVAFPQWGDQVTDKYLVDVFKVGVVRMCRGEAENKLITRDEVEKCLIEATTEGKAAELKENTMKWKKAEEVAE  
GGSSDRNLQEFVDEVRMSMELVCKSKKI

>VvgGT3

MGSESKLVHVFLVSFPGQGHVNPLRLGKRLASKGLLVTFSTPESIGKQMRKASNITDQPTPVGDGMIRFEFFED  
GWDENEPKRQDLDLYLPLQLELVGKKIIPMIKKNAEQDRPVSCLIINNPFIPWVSDVAADLGLPSAMLWVQSCACF  
STYYHYHGLVFPFSEAEPEIDVQLPCTPLLYKYDEVASFLYPTTPYPFLRRAILGQYKNDPKFCILMDTFQELE  
PEVIKYMSKICPIKPVGPLYKNPKVPNAAVRGDFMKADDCIEWLDSKPPSSVVIISFGSVVYLKQDQVDEIAYGL  
LNSGVQFLWVMKPPHKDAGLELLVLPEGFLEKAGDKGMVQWSPQEQVLAHPSVACFVTHCGWNSMEALSSGMP  
VVAFPQWGDQVTDKYLVDVFKVGVVRMCRGEAENKLITRDEVEKCLIEATTEGKAAELKQNAMKWKKAEEVAE  
GGSSDRNLQEFVDEVSMSMVLVCQSNKI

>Vv\_GAT1

MAAKRPSNSSMFHGGLFLRLLLVLVLSANAASAGSIVEYLPYGNLTFKLETGYVSVGDSELYFYFIESQGNPQT  
DPFFLWLTGGPGCSSFNGLIYEIGPMEFDIHNYPGGLPRLPYKYAWTKTASILFLDAPVGTGFSYSTSADGWSS  
SDTDSALETYEFRLKWLIEHPKYLPLQLYVGGDSYSGIIVPLVVKHIVDAIDEHTVPRFNLQGYLVGSPPTDENI  
NTNAKVFAHRLALISDELYEAAKENCNGNYADVDPSTKCLSSLGEIQHCVKDLFRNDILEPKCVFESPEPTRR  
SLDEKPGDFILNTPKLEEFWCRNFNYALSIIWANDESQVEALNVRVGTVKYWSRCNKSLSYTKDVQSVIDVHRYL  
SKKQLEVLVEVGDRDLVVPYPGAVEWIRLLNLTIVSPWRPWFVDGEIAGYTEKHSQNGYRLTYATVKASTTIFYT  
FPSLFLCQIESK

>VvGAT1\_Bis

MAAKRPSNSSMFHGGLFLRLLLVLVLSANAASAGSIVEYLPYGNLTFKLETGYVSVGDSELYFYFIESQGNPQT  
DPFFLWLTGGPGCSSFNGLIYEIGPMEFDIHNYPGGLPRLPYKYAWTKTASILFLDAPVGTGFSYSTSADGWSS  
SDTDSALETYEFRLKWLIEHPKYLPLQLYVGGDSYSGIIVPLVVKHIVDAIDEHTVPRFNLQGYLVGSPPTDENI  
NTNAKVFAHRLALISDELYEAAKENCNGNYADVDPSTKCLSSLGEIQHCVKDLFRNDILEPKCVFESPEPTRR  
SLDEKPGDFILNTPKLEEFWCRNFNYALSIIWANDESQVEALNVRVGTVKYWSRCNKSLSYTKDVQSVIDVHRYL  
SKKQLEVLVEVGDRDLVVPYPGAVEWIRLLNLTIVSPWRPWFVDGEIAGYTEKHSQNGYRLTYATVKAGHTAPE  
YRRECYMFKRWVHYYPL

>VvGAT2

MATATPSQEEQSLKILFNSRSSMSRMCFISILLLLFFTGAVTSQSIVETLPGFPGKLPFKLETGYISVGDVDDVQL  
FYYFIESERNPRLDPLVLWLTGGPGCSGFSALVYIEIGPLAFDVEGYDGLPTLKLNPYSWTKVASIIFIDAPVGT  
GFSYAETSYGYNVSDTSSAAQTYQFLRKWLTFFHPNFAGNPLYIGGDSYSGIVAPILIKDILHGLEVGLQPKIELQ  
GYLLGNPLTDYLIDDNSRIPIYHRVSLISDGLYKAAKETCNGDYGNVDINNTLCVEALQTIKMCLLQINIAMILE  
PQCAFASPQTTELQWDLRVQENTTMNYLLSLSRIPELRCRSFSYVLSYKWLNDINVQNALHVQPGTVKTRRCPK  
SFPSYTENVSDTVAYHKNFTRTGLRALIYSGDHDLPSTPIGTLEWIKSLDVPVFDKWRPWYVDGQIAGYTTKFMN  
DHYRLTYATLKGAGLTAPEYKHESLALVDRWFAYYPIKGGRADPAFLYKVVISMVSKGEELFT

## ANNEXE 2 : MILIEU DE CULTURE

Les milieux de laboratoires sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 120°C. Pour la préparation des milieux solides, 15g/l d'agar sont ajoutés avant autoclavage. La composition des milieux de cultures est donnée ci-dessous :

### 1- Milieux Bactériens

#### 1.1- Milieu LB (Luria Broth)

Tryptone (Bacto tryptone, Difco)	10 g.L <sup>-1</sup>
Extrait de levure (Yeast extract, Difco)	5 g.L <sup>-1</sup>
NaCl (Chlorure de sodium)	10 g.L <sup>-1</sup>

Le milieu LB (Luria Broth) est utilisé pour la croissance des souches d'*E. coli* en milieu liquide ou sur milieu gélosé (Agar (Difco) 15 g.L<sup>-1</sup>). Il est rendu sélectif par l'addition d'antibiotiques appropriés (ampicilline 100 µg.mL<sup>-1</sup>, kanamycine 50 µg.mL<sup>-1</sup> et spectromycine 75 µg.mL<sup>-1</sup>).

#### 1.2- Milieu LB Low salt

Tryptone (Bacto tryptone, Difco)	10 g.L <sup>-1</sup>
Extrait de levure (Yeast extract, Difco)	5 g.L <sup>-1</sup>
NaCl	5 g.L <sup>-1</sup>

Le milieu LB low salt est utilisé pour la croissance des souches d'*E. coli* contenant le vecteur pPIC conférant une résistance à la Zeocine en milieu liquide ou sur milieu gélosé. Il est stérilisé par autoclavage puis rendu sélectif par l'addition d'antibiotiques appropriés (Zéocine 100 µg.mL<sup>-1</sup>). La faible teneur en sel du milieu LB low salt est indispensable afin d'éviter une force ionique trop élevée qui limite l'efficacité de la zéocine.

#### 1.3- Milieu MGL/B media

Manitol (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> )	5 g.L <sup>-1</sup>
L-Glutamate (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub> Na)	1 g.L <sup>-1</sup>
Potassium phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,15 g.L <sup>-1</sup>
Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0,05 g.L <sup>-1</sup>
Fer EDTA (FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	2,5 mL.L <sup>-1</sup>
Tryptone (Bacto peptone, Difco)	5 g.L <sup>-1</sup>
Extrait de levure (Yeast extract, Difco)	2,5 g.L <sup>-1</sup>
NaCl (Chlorure de sodium)	5 g.L <sup>-1</sup>
Biotine (1mg.L <sup>-1</sup> )	5 µL.L <sup>-1</sup>

Le milieu MGL/B est utilisé pour la croissance des souches d'*A.rhizogenes* en milieu liquide ou sur milieu gélosé (Micro Agar 10 g.L<sup>-1</sup>). Le pH est ajusté à pH 7 avec du NaOH 1N. Il est stérilisé par autoclavage (20 min, 120°C) puis rendu sélectif par l'addition d'antibiotiques appropriés (spectinomycine 50µg.mL<sup>-1</sup>).

## **2-Milieu Levurien**

### **2.1- Milieu YTA2X**

Tryptone (Bacto peptone, Difco)	10 g.L <sup>-1</sup>
Extrait de levure (Yeast extract, Difco)	10 g.L <sup>-1</sup>
NaCl (Chlorure de sodium)	5 g. L <sup>-1</sup>

Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH 1N, puis stérilisé par autoclavage puis rendu sélectif par l'addition d'antibiotiques appropriés (ampicilline 100 µg.ml final)

### **2.2- Milieu YPD**

Peptone (Bacto peptone, Difco)	20 g.L <sup>-1</sup>
Extrait de levure (Yeast extract, Difco)	10 g.L <sup>-1</sup>
Glucose 20% (Sigma-Aldrich)	100ml. L <sup>-1</sup>

Le milieu YPD est utilisé pour la croissance des souches de *S. cerevisiae* sans pression de sélection en milieu liquide ou sur milieu gélosé. Il est stérilisé par autoclavage.

### **2.3- Milieu YPDS**

Peptone (Bacto peptone, Difco)	20 g.L <sup>-1</sup>
Extrait de levure (Yeast extract, Difco)	10 g.L <sup>-1</sup>
Sorbitol (1M)	182.2g
Glucose 20%	100ml

Le milieu YPDS est utilisé pour la croissance des souches de *Pichia pastoris* en milieu liquide ou sur milieu gélosé. Il est stérilisé par autoclavage puis rendu sélectif par l'addition d'antibiotiques appropriés (Zéocine 100 µg.mL<sup>-1</sup>).

### **2.4- Milieu SD sans uracile (1litre)**

Source de carbone (Sigma-Aldrich)(glucose /galactose/ raffinose ) 20%	100mL
Bacto YNB avec (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)	6.7 g.L <sup>-1</sup>
Mix Acides Aminés 10X	100 mL

Le milieu de croissance minimum SD est utilisé pour la croissance de *S. cerevisiae* en milieu liquide ou sur milieu gélosé. Il est stérilisé par autoclavage puis rendu sélectif par l'absence d'uracile dans le mélange d'acides aminés.

- Solution mère 10X d'acides aminées (pour 1L ) sans uracile

L-Isoleucine	300 mg.L <sup>-1</sup>
L-Valine	1500 mg.L <sup>-1</sup>
L-Adenine hemisulfate	200 mg.L <sup>-1</sup>
L-Arginine HCl	200 mg.L <sup>-1</sup>
L-Lysine HCl	300 mg.L <sup>-1</sup>
L-Methionine	200 mg.L <sup>-1</sup>
L-Phenylalanine	500 mg.L <sup>-1</sup>
L-Thréonine	2000 mg.L <sup>-1</sup>
L-Tyrosine	300 mg.L <sup>-1</sup>
L-Tryptophane	200 mg.L <sup>-1</sup>
L-Histidine HCl monohydrate	200 mg.L <sup>-1</sup>
L-Leucine	1000 mg.L <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> O MQ	qsp 1L

Le mélange d'acides aminés est stérilisé sous vapeur fluante et stocké à -20°C.

## 2.5- Milieu *Pichia pastoris* 33X

<u>Milieu synthétique pichia (En erlenmeyer)</u>		
FM21 (10X)		100ml. L <sup>-1</sup>
PTM1 (100X)		10ml. L <sup>-1</sup>
Solution tampon tartrate / phtalate pH5.4		800ml. L <sup>-1</sup>
Biotine		80µg. L <sup>-1</sup>
Source de carbone	Glycérol	40 g. L <sup>-1</sup>
	Methanol	5 g. L <sup>-1</sup>

<u>Milieu synthétique pichia (En culture fed- batch)</u>		
PTM1 (100X)		10ml. L <sup>-1</sup>
Biotine		1mg. L <sup>-1</sup>
Methanol		780 g. L <sup>-1</sup>

Afin de préparer les milieux synthétiques pour *Pichia*, plusieurs solutions devaient être préparé auparavant.

- *Solution FM21 (10X)- Solution de sels minéraux*

H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .NH <sub>4</sub> (Monoammonium dihydrogen phosphate)	30 g.L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Ammonium Sulfate)	10g .L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (d=1.71) 85% (Acide phosphorique)	35mL
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Potassium sulfate)	23.8 g. L <sup>-1</sup>
CaSO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O (Calcium sulfate di- hydrate)	1.5 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (Magnesium sulfate)	19.5 g. L <sup>-1</sup>
KOH ( <i>hydroxyde</i> de potassium)	6.5 g. L <sup>-1</sup>

La solution de sels minéraux est autoclavée

- *Solution PTM1 (100X)- solution d'oligo-élément*

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2 mg. L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.6 g. L <sup>-1</sup>
KI	10 mg L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.3 g. L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	20 mg. L <sup>-1</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	2 g. L <sup>-1</sup>
Fe (SO <sub>4</sub> ), 7H <sub>2</sub> O	6.5 g. L <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (d=1.83) 96%	2 ml

La solution d'oligo- éléments est filtrée sur filter Millipore 0.45 µm HA

- *Tampon phthalate pH = 5.4 :*

Phtalate acide de potassium	20.42 g. L <sup>-1</sup>
NaOH (0.2M)	2.56 g. L <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> O MilliQ qsp 1L	

La solution est autoclave et stocké à +4°C

- *Tampon tartrate pH = 5.4 :*

Acide tartrique	7.5 g. L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	35.85 g. L <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> O MilliQ qsp 1L	

La solution est autoclavée et stocké à +4°C

Antimousse 153K (Cognis) : 2ml/l

### **3-Milieu Plante**

#### **3.1- Milieu MS/2 (1 litre)**

Macro MS (10X)	50 mL.L <sup>-1</sup>
Micro MS (100X)	10 mL.L <sup>-1</sup>
Fer (EDTA) (200X)	5 mL.L <sup>-1</sup>
Vitamine MG	1 mL.L <sup>-1</sup>
Saccharose	20 g.L <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> O MQ	qsp 1L

Le pH du milieu est ajusté à 6,5 avec du KOH 1N et autoclavé. Le milieu MS/2 peut être utilisé pour la croissance des vitroplants de vigne sur milieu gélosé (Micro Agar 8 g.L<sup>-1</sup>).

- Solution mere d'oligo- elements: Macro MS (10X)

KNO <sub>3</sub> (Potassium Nitrate)	19 g.L <sup>-1</sup>
--------------------------------------	----------------------

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Ammonium nitrate)	16,5 g.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O (calcium chlorure)	4,4 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (Magnesium sulfate)	3,7 g.L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (potasium phosphate)	1,7 g.L <sup>-1</sup>

Cette solution est stérilisée par filtration et stockée à 4°C

- Solution Fer (EDTA) 200X

FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 99 %	4,552 g.L <sup>-1</sup>
Na (EDTA) (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	7,45 g. L <sup>-1</sup>

Le Na<sub>2</sub>(EDTA) est ajouté 2 minutes après ébullition de l'eau MilliQ. Le fer est par la suite ajouté et bouillit et le mélange est maintenu à l'abri de la lumière jusqu'à ce qu'il soit froid.

La solution est ensuite filtrée à l'aide d'un entonnoir équipé d'un filtre et stocké à 4°C à l'abri de la lumière.

### 3.2- Milieu LGO

Macro LGO (10x)	100 mL.L <sup>-1</sup>
Micro MS (100x)	10 mL.L <sup>-1</sup>
Fer (EDTA) (x200)	10 mL.L <sup>-1</sup>
Vitamine renforcée	2 mL.L <sup>-1</sup>
Caséine	0,25 g.L <sup>-1</sup>
Saccharose	25 g.L <sup>-1</sup>

Le milieu LGO est utilisé pour la croissance des tissus hairy roots sur milieu gélosé (Phytigel 5 g.L<sup>-1</sup>). Le pH est ajusté à 6 avec du KOH 1N, puis stérilisé par autoclavage (20 min, 120°C). Afin de prévenir la croissance bactérienne, de cefotaxime (200 µg.mL<sup>-1</sup> final) et de l'Augmentin (200 µg.mL<sup>-1</sup> final) sont ajoutés dans le milieu.

- Macro LGO 10X

KNO <sub>3</sub> (potassium nitrate)	15 g.L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Amonium nitrate)	1,5 g.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (calcium Chlorure)	1,5 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (Magnesium sulfate)	2,5 g.L <sup>-1</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (Sodium phosphate)	2,17 g.L <sup>-1</sup>

Non autoclavé et stocké à 4°C.

- Micro MS 100X

MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (magnèse (II) sulfate)	1.99 g.L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Acide borique)	0.62 g.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (Nitrium molybdat)	25 mg.L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (cuivre (II) sulfate)	2.65mg.L <sup>-1</sup>

Ki (Potassium iodure)	83 mg.L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (Cobalt chloride)	25 mg.L <sup>-1</sup>
Non autoclavé et stocké à 4°C.	

#### 4- Antibiotique

<i>Cefotaxime 200g/l</i>		<i>Ampicilline 100g/l</i>	
<i>Cefotaxime</i>	<i>1g</i>	<i>Ampicilline</i>	<i>1g</i>
<i>Eau sterile</i>	<i>5ml</i>	<i>Eau sterile</i>	<i>10ml</i>
<i>Augmentin 200g/l</i>		<i>Spectinomycine 50g/l</i>	
<i>Augmentin</i>	<i>1g</i>	<i>Spectinomycine</i>	<i>0.5g</i>
<i>Eau sterile</i>	<i>5ml</i>	<i>Eau sterile</i>	<i>10ml</i>
<i>Kanamycine 100g/l</i>		<i>Hygromycine 25mg/l</i>	
<i>Kanamycine</i>	<i>1g</i>	<i>Hygromycine</i>	<i>125mg</i>
<i>Eau sterile</i>	<i>10ml</i>	<i>Eau sterile</i>	<i>5ml</i>
<i>Acétosyringone 100g/l</i>			

Toutes les solutions d'antibiotiques sont filtrées stérilement sous hottes avec un filtre de 0.22µm et aliquotées dans des eppendorfs de 1.5ml avant d'être stocké à -20°C.

#### 5- vitamines

- Solution mère de vitamines : MG (Milieu Morel-Galzy) (pour 1L)

Myo inositol (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	50 g.L <sup>-1</sup>
Acide nicotinique (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	1g.L <sup>-1</sup>
Thiamine HCl C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> C <sub>12</sub> N <sub>4</sub> OS.HCl	1 g.L <sup>-1</sup>
Pyrodoxine HCl	1g.L <sup>-1</sup>
Panthoténate de calcium C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub> N <sub>8</sub> Ca	1 g.L <sup>-1</sup>
Biotine (1mg/ml)	10 mL.L <sup>-1</sup>

La préparation est filtrée sous hotte (0.22µm), aliquotée dans des tubes de 5ml et stocké à -20°C

- Vitamines renforcées

Myo inositol (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	5g
Acide nicotinique (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )(Vit B3)	0.5g
Thiamine HCl C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> C <sub>12</sub> N <sub>4</sub> OS.HCl	0.5g
Pyridoxine HCl	0.05g
Panthoténate de calcium C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub> N <sub>8</sub> Ca	0.05g
Biotine 1mg/ml)	0,5 mL

La préparation est filtrée sous hotte (0.22µm) et stocké à -20°C

## ANNEXE 3 : TECHNIQUE DE CULTURE DE PICHIA PASTORIS : SYSTEME DE PRODUCTION

### 1- Système de micro- fermenteur

Les transformants de *P. pastoris* sont sélectionnés sur milieu synthétique contenant :

- Glycérol (20g.L<sup>-1</sup>) dans un tampon phthalate ou tartrate pH5.4 (100mM).
- 100ml.L<sup>-1</sup> de sels minéraux FM21+ N (10X)
- 10 ml.L<sup>-1</sup> d'oligoéléments PTM1 (100X)
- 5 ml.L<sup>-1</sup> D- biotine
- Antimousse 153K 10% (v/v) 2ml/L

Description du diapositif : Le système est composé de :

- 32 tubes de culture avec capuche, chaque tube de 13 ml de volume total, renferme 5ml de milieu de culture.
- 1 réservoir A renfermant 600ml d'eau + 1ml NH<sub>3</sub> à 32% (concentration finale : 0.055%)
- 1 réservoir A renfermant 600ml d'eau + 1ml NH<sub>3</sub> à 32% (concentration finale : 0.055%) + 19.2 ml Méthanol (concentration finale : 32% v/v)
- 32 tubes inox DI : 0.5 mm (tube HPLC) longueur 15cm
- Tuyaux souples autoclavables + 35 raccords en T ou Y
- 1 filtre à air (0.45µm)
- 4 diffuseurs d'air (Crepins HPLC), 2 par réservoir
- 1 débitmètre

#### Principe

Le pH est maintenu entre 5.5 et 3.5 par entrainement d'ammoniaque (0.055%) grâce à un débit d'air de 0.0261 ml/min par tube. Au cours de l'induction, l'apport en méthanol est effectué par entrainement vers les tubes de culture.

Conditions de culture de ce système :

- L'aération est assurée par un flux, d'air continu. Le système d'aération mis en place a un débit d'air de 0.0261 ml/min/tube qui est contrôlé grâce à un débitmètre.
- Le pH est maintenu dans une gamme de valeur compatible avec la croissance et la production de biomasse, grâce à l'apport d'ammoniaque par l'aération.
- L'agitation est créée grâce à l'arrivée de l'air dans le milieu de culture.
- La température du milieu de culture est de 28°C.

Ce système permet de cultiver 32 transformants simultanément.

### 2- Système en fermenteur

Les fermentations ont été réalisées dans un fermenteur Applikon de 3l avec 1.5l volume utile. Le régulateur « Bio controller » assure le contrôle du pH et de la PO<sub>2</sub>. L'acquisition des

données et le contrôle du débit des pompes d'alimentation ont été effectués par le logiciel Bioexpert.

### *2.1- Transfert d'oxygène*

La mesure de la pression partielle d'oxygène dissous dans la phase liquide est réalisée par une sonde polarographique Ingold R. le débit d'aération est contrôlé par un débitmètre massique Brooks (0 à 5 volume d'air insufflé par volume de milieu et par minute). L'aération a été fixée à 1 v.v.m. Le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide est assuré par l'intermédiaire de Pale de type Rushton et de contre- pales fixes pour limiter l'effet vortex. Les pales sont mises en mouvement par le moteur Applikon à vitesse variable et contrôlée (0 à 2000tr/min). Les fermentations ont été réalisées avec un taux d'oxygénation supérieur à 30%.

### *2.2- Régulation de pH*

Le pH est mesuré à l'aide d'une sonde Ingold. La régulation proportionnelle du pH s'est faite par ajout d'ammoniaque 15% (v/v) et d'acide sulfurique 2N, faisant intervenir deux pompes Masterflex<sup>R</sup> pilotées par le « Bio controller ». L'ammoniaque sert de source d'azote.

### *2.3- Contrôle de débit d'alimentation en milieu de culture*

Lors des cultures fed- batch, le débit d'alimentation en milieu frais est assuré par une pompe à piston B. Braun, contrôlée par l'intermédiaire d'une carte PCL- 812 PG, d'un boîtier ADDA et d'un ordinateur. Le logiciel Bioexpert assure l'interface entre les différents organes.

## ANNEXE 4 : ANALYSE DES SEQUENCES DES PEPTIDES PRODUITS PAR P. PASTORIS

Après séquençage MS-MS, les séquences des peptides ont été comparées d'une part aux séquences protéiques de la base de données Vitis + GAT1 qui correspond à l'ensemble des peptides théoriques codés par la version 12X du génome de la vigne dans laquelle nous avons ajouté VvGAT1 et d'autre part à la base NCBI (NCBI nr, à la date du 2010\_10\_18). Le tableau suivant présente les résultats obtenus pour les peptides 17kDa et 30 kDa .

<b>Commentaire Rapport</b>		L'état fonctionnel de notre instrumentation a été vérifié par l'introduction d'un contrôle positif (BSA à 25 fmol) lors de la séquence d'analyse. La validation des protéines est basée sur un score peptidique individuel (pour $p < 0.05$ ) supérieur à 56 lors de l'interrogation sur la banque NCBI nr en All Entries et supérieur à 30 sur la banque vitis GAT.				
Echantillon		Database			Date & Time	
PF_101122_CHEYNIER_17KDB_allentries_8		NCBI nr			6 Dec 2010 at 10:32:51 GMT	
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
gi 30377	cytokeratin 13 [Homo sapiens]	46179	92	1	2%	1
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
262	R.ALEENADLEVK.I	92	651.4	1300.65	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
gi 124004840	TonB-dependent receptor domain protein [Microscilla marina ATCC 23134]	89013	66	1	1%	3
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
202	K.GVITDAKGR.F	66	458.8	915.514	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
gi 254571485	Protein that binds to cruciform DNA structures [Pichia pastoris GS115]	32210	61	1	3%	5
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
241	K.VPEVSEEPASK.T	61	586.4	1170.58	2+	none
Echantillon		Database			Date & Time	
PF_101122_CHEYNIER_17KD_vitisGAT_8		Vitis + GAT1			6 Dec 2010 at 09:00:08 GMT	
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
GSVIVT01035416001	GSVIVT01035416001	55809	34	1	1%	1
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
191	R.LATGEPLR.L	34	428.7	855.481	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot	Pept Nb	Seq	Hit rank

		Score	Cov
<a href="#">GSVIVT01025815001</a>	GSVIVT01025815001	186041	33
		1	0%
		2	

Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">214</a>	K.SLKAAESER.E	33	495.9	989.514	2+	none

Echantillon	Database	Date & Time
PF_101122_CHEYNIER_30KDA_allentries_1	NCBIInr	3 Dec 2010 at 15:26:46 GMT

Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 15218936</a>	PEN3 (PENETRATION 3); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances / cadmium ion transmembrane transporter [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	165831	475	7	5%	1

Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">25</a>	K.TLLLLALAGK.L	58	500.9	999.633	2+	none
<a href="#">262</a>	R.YDLLNELAR.R	62	553.8	1105.58	2+	none
<a href="#">266</a>	R.SLPTLLNVVR.N	68	556.4	1110.68	2+	none
<a href="#">311</a>	K.MSNELAVPFDK.S	70	633.9	1265.6	2+	Oxidation (M)
<a href="#">316</a>	K.GTADFLQEVTSK.K	90	648.4	1294.64	2+	none
<a href="#">324</a>	R.IQVLGGAPDLTVK.Q	64	655.9	1309.76	2+	none
<a href="#">412</a>	R.DSIVGLPGVTGLSTEQR.K	63	864.9	1727.91	2+	none

Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 15234666</a>	AHA2; ATPase/ hydrogen-exporting ATPase, phosphorylative mechanism [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	104734	417	5	6%	2

Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">254</a>	R.EAQWALAQR.T	57	536.8	1071.55	2+	none
<a href="#">275</a>	K.MITGDQLAIGK.E	70	573.9	1145.61	2+	none
<a href="#">285</a>	K.GAPEQILELAK.A	64	584.9	1167.65	2+	none
<a href="#">356</a>	K.ADIGIADVADATDAAR.G	104	715.4	1428.72	2+	none
<a href="#">377</a>	K.KADIGIADVADATDAAR.G	64	779.5	1556.82	2+	none

Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 297840569</a>	PDR8/PEN3 [ <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ]	165555	398	6	4%	3

Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
-------	----------	-------	-----------	------------	--------	---------------

<a href="#">25</a>	K.TLLLLALAGK.L	58	500.9	999.633	2+	none
<a href="#">262</a>	R.YDLLNELAR.R	62	553.8	1105.58	2+	none
<a href="#">266</a>	R.SLPTLLNVVR.N	68	556.4	1110.68	2+	none
<a href="#">316</a>	K.GTADFLQEVTSK.K	90	648.4	1294.64	2+	none
<a href="#">368</a>	K.VVEYFESFPGVPK.I	58	749.4	1496.76	2+	none
<a href="#">412</a>	R.DSIVGLPGVTGLSTEQR.K	63	864.9	1727.91	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 242084386</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g023070 [Sorghum bicolor]	105642	359	4	5%	4
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">275</a>	K.MITGDQLAIGK.E	70	573.9	1145.61	2+	none
<a href="#">356</a>	K.ADIGIAVADATDAAR.S	104	715.4	1428.72	2+	none
<a href="#">377</a>	K.KADIGIAVADATDAAR.S	64	779.5	1556.82	2+	none
<a href="#">434</a>	R.WTEEDAAILVPGDIVSIK.L	63	978.5	1955.03	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 160961491</a>	keratin, type II cytoskeletal I [Pan troglodytes]	65621	358	5	9%	5
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">310</a>	R.TNAENEFVTIK.K	67	633.4	1264.63	2+	none
<a href="#">314</a>	K.LALDLEIATYR.T	81	639.4	1276.7	2+	none
<a href="#">339</a>	K.LNDLEDALQQAK.E	72	679.4	1356.69	2+	none
<a href="#">349</a>	K.SLNNQFASFIDK.V	61	692.4	1382.68	2+	none
<a href="#">364</a>	R.FLEQQNQVLQTK.W	80	738.3	1474.78	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 5103820</a>	Similar to gb Z70524 PDR5-like ABC transporter from Spirodela polyrrhiza and is a member of the PF 00005 ABC transporter family. ESTs gb N97039 and gb T43169 come from this gene [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	164409	355	5	4%	6
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">25</a>	K.TLLLLALAGK.L	58	500.9	999.633	2+	none
<a href="#">262</a>	R.YDLLNELAR.R	62	553.8	1105.58	2+	none
<a href="#">316</a>	K.GTADFLQEVTSK.K	90	648.4	1294.64	2+	none
<a href="#">368</a>	K.VVEYFESFPGVPK.I	58	749.4	1496.76	2+	none

<a href="#">409</a>	R.DAIVGLPGVTGLSTEQR.K	88	857	1711.91	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 28317</a>	unnamed protein product [Homo sapiens]	59720	276	3	6%	10
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">224</a>	R.VLDELTLTK.A	64	516.4	1030.59	2+	none
<a href="#">258</a>	K.VTMQNLNDR.L	70	545.8	1089.52	2+	none
<a href="#">348</a>	R.ALEESNYELEGK.I	86	691.4	1380.64	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 254564921</a>	Cell wall protein with similarity to glucanases [Pichia pastoris GS115]	36208	250	4	13%	11
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">238</a>	K.TAEEVASDLSQLTGYEIIR.L	74	1048	2094.05	2+	none
<a href="#">358</a>	K.GVTYSPYQAGGGCK.T	78	722.9	1443.65	2+	none
<a href="#">403</a>	R.LYGVDCNQVENVFK.A	98	842.9	1683.79	2+	none
<a href="#">454</a>	K.TAEEVASDLSQLTGYEIIR.L	69	699.2	2094.05	3+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 146741296</a>	keratin 1 [Sus scrofa]	65331	199	3	5%	12
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">263</a>	K.AQYEEIAQR.S	59	554.3	1106.54	2+	none
<a href="#">349</a>	K.SLNNQFASFIDK.V	61	692.4	1382.68	2+	none
<a href="#">364</a>	R.FLEQQNQVLQTK.W	80	738.3	1474.78	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 186685</a>	keratin type 16 [Homo sapiens]	51010	145	2	4%	15
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">258</a>	K.VTMQNLNDR.L	70	545.8	1089.52	2+	none
<a href="#">317</a>	R.ALEEANADLEVK.I	75	651.4	1300.65	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 15236043</a>	TIP2;2 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2;2); water channel [Arabidopsis thaliana]	25178	90	1	6%	21

Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">387</a>	K.IEIGSVGDSFSVASLK.A	90	804.9	1607.84	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 9972377</a>	Putative ABC transporter [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	132543	87	1	1%	23
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">428</a>	K.ILLLDEATSALDAESER.L	87	923.6	1844.94	2+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 1514977</a>	VM23 [ <i>Raphanus sativus</i> ]	25874	61	1	9%	30
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">487</a>	R.AALAEFISTLIFVFAGSGSIAFNK.L	61	844.5	2530.35	3+	none
Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">gi 136406</a>	RecName: Full=Cationic trypsin; Flags: Precursor	26837	57	1	4%	33
Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">231</a>	K.LSSPATLNSR.V	57	523.3	1044.56	2+	none

Echantillon	Database	Date & Time
<a href="#">PF_101122_CHEYNIER_30KDA_vitisGAT_1</a>	Vitis + GAT1	3 Dec 2010 at 15:03:00 GMT

Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
<a href="#">GSVIVT01001052001</a>	GSVIVT01001052001	105157	415	7	6%	1

Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<a href="#">175</a>	R.LLEGDPLK.I	35	442.8	883.502	2+	none
<a href="#">190</a>	R.ALNLGVNVK.M	48	464.3	926.555	2+	none
<a href="#">254</a>	R.EAQWALAQR.T	57	536.8	1071.55	2+	none
<a href="#">267</a>	R.ELSEIAEQAK.R	37	559.3	1116.57	2+	none
<a href="#">275</a>	K.MITGDQLAIGK.E	70	573.9	1145.61	2+	none
<a href="#">356</a>	K.ADIGIAVADATDAAR.S	104	715.4	1428.72	2+	none
<a href="#">377</a>	K.KADIGIAVADATDAAR.S	64	779.5	1556.82	2+	none

Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
-----------	-------------	------	------------	---------	---------	----------

Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
GSVIVT01029244001	GSVIVT01029244001	105613	402	7	6%	2

Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<u>175</u>	R.LLEGDPLK.V	35	442.8	883.502	2+	none
<u>190</u>	R.ALNLGVNVK.M	48	464.3	926.555	2+	none
<u>230</u>	K.LGDIIPADAR.L	58	520.8	1039.57	2+	none
<u>254</u>	R.EAQWALAQR.T	57	536.8	1071.55	2+	none
<u>267</u>	R.ELSEIAEQAK.R	37	559.3	1116.57	2+	none
<u>356</u>	K.ADIGIAVADATDAAR.G	104	715.4	1428.72	2+	none
<u>377</u>	K.KADIGIAVADATDAAR.G	64	779.5	1556.82	2+	none

Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
GSVIVT01016991001	GSVIVT01016991001	107103	210	6	4%	6

Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<u>25</u>	K.TTLLALAGK.L	58	500.9	999.633	2+	none
<u>38</u>	K.TTLMVLAGR.K	45	538.8	1075.57	2+	none
<u>260</u>	K.TTLMVLAGR.K	51	546.8	1091.56	2+	Oxidation (M)
<u>290</u>	R.MTLLGPPSSGK.T	44	600.9	1199.66	2+	none
<u>293</u>	R.MTLLGPPSSGK.T	55	608.9	1215.65	2+	Oxidation (M)
<u>300</u>	R.VTTGEMIVGPTK.T	45	624.9	1247.64	2+	Oxidation (M)

Accession	Description	Mass	Prot Score	Pept Nb	Seq Cov	Hit rank
GSVIVT01016998001	GSVIVT01016998001	165715	195	5	2%	7

Query	Sequence	Score	Masse Obs	Masse Calc	Charge	Modifications
<u>38</u>	K.TTLMVLAGR.K	45	538.8	1075.57	2+	none
<u>260</u>	K.TTLMVLAGR.K	51	546.8	1091.56	2+	Oxidation (M)
<u>290</u>	R.MTLLGPPSSGK.T	44	600.9	1199.66	2+	none
<u>293</u>	R.MTLLGPPSSGK.T	55	608.9	1215.65	2+	Oxidation (M)
<u>316</u>	K.GTADFLQEVTSK.K	90	648.4	1294.64	2+	none